Archive of SID

بررسی اثر داروهای استفاده شده در درمان آرتریت روماتوئید بر تولید نیتریک اکساید در ماکروفاژهای صفاق موش Balb/C

چکیده

مقدمه: آرتریت روماتوئید (RA)، یک اختلال التهابی پیشرونده است، که مشخصه ی آن، پلی‌آرتریت همراه با علایم سیستمیک گوناگون است. تولید نیتریک اکساید (NO) در سرم و مایع سینوویال مبتلایان به آرتریت روماتوئید افزایش می‌یابد و به نظر می‌رسد، که در پدیده ی التهاب در این بیماری نقش داشته باشد. هدف از این پژوهش، پاسخ به این پرسش است که، آیا داروهای استفاده شده در درمان آرتریت روماتوئید بر روی تولید نیتریک اکساید اثر دارند و آیا، اثر این داروها بر روی میزان نیتریک اکساید با یکدیگر تفاوتی دارد.
روش کار: به این منظور، اثرات میزان های گوناگون (۱۰۰۰-۱μM) از متوترکسات، سولفاسالازین، کلروکوئین و آزاتیوپرین بر تولید نیتریک اکساید القاء شده با IFN - γ و Lipopolysaccharide (LPS) در ماکروفاژهای صفاق موش Balb/C بررسی شد و میزان نیتریک اکساید تولید شده، با روش گریس(Griess) اندازه گیری گردید. **یافته ها:** آزاتیوپرین، کلروکوئین و سولفاسالازین، به ترتیب در یک شکل وابسته به میزان دارو اثر جلوگیری کننده بر روی تولید نیتریک اکساید داشتند. آزاتیوپرین در همه ی میزان ها باعث کاهش معنی دار آماری تولید نیتریک اکساید گردید ($p<۰/۰۵$). کلروکوئین و سولفاسالازین باعث کاهش معنی دار آماری تولید نیتریک اکساید در میزان ۱۰-۱۰۰۰ μM گردیدند ($p<۰/۰۵$) اما متوترکسات تنها در دوز ۱۰۰۰μM باعث کاهش معنی دار آماری تولید نیتریک اکساید گردید ($p<۰/۰۵$).
نتیجه: داروهای آزاتیوپرین، کلروکوئین، سولفاسالازین و متوترکسات، به ترتیب باعث کاهش نیتریک اکساید در ماکروفاژهای صفاق موش می شوند که این اثر وابسته به میزان دارو است.

کلید واژه ها: آرتریت روماتوئید، سولفاسالازین، کلروکوئین، آزاتیوپرین، متوترکسات، نیتریک اکساید

دکتر رضا امین*،
دکتر انسیه علی آبادی**،
دکتر سارا کاشف*،
* دانشیار گروه کودکان،
** استادیار بخش تحقیقات پزشکی،
دانشگاه علوم پزشکی شیراز

نویسنده مسوول:
دکتر رضا امین
شیراز، بیمارستان نمازی،
دفتر گروه کودکان
تلفن: ۰۷۱۱-۶۲۶۵۰۲۴

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

آرتریت روماتوئید (RA) یک بیماری سیستمیک با علت ناشناخته است، که مشخصه ی آن، التهاب مفصل ها و از دست رفتن تدریجی و پیشرونده ی غضروف مفصلی و استخوان زیر غضروف است. تصویر آسیب شناختی آن، التهاب مفصل ها، تکثیرسینوویال و ارتشاح سلول های منونوکلئر است، که نتیجه ی تولید تنظیم نشده ی سیتوکین ها، عوامل رشد، مولکول های چسبندگی سلول و مدیاتورهای غیر پروتئینی، مانند متابولیت های اسید آراشیدونیک و واسطه های فعال اکسیژن است. نیتریک اکساید ممکن است یک مدیاتور حیاتی در این آبشار التهابی باشد[۱].

نیتریک اکساید از ال- آرژینین تولید شده و در اثر اکسیداسیون ال- آرژینین، ال-سیترولین و NO تولید می‌گردد. این واکنش، به وسیله ی گروهی از آنزیم های NOs کاتالیز می گردد، که عبارتند از NOs نورونی (NOs1)، Nos اندوتلیال (NO3) (NO3) القایی (NOs2 یا iNOs)[۲،۱].

با افزایش بیان NOs2 و تولید نیتریک اکساید در نمونه های حیوانی، آرتریت القایی یا خودبه خودی مشاهده شده است و جلوگیری‌کننده‌های NOs می‌توانند باعث کاهش آرتریت در این شرایط گردند. افزون بر این، سرم و مایع سینوویال افراد مبتلا به آرتریت روماتوئید، افزایش میزان کاتابولیت های نیتریک اکساید را نشان می‌دهند. همچنین، بافت سینوویال افراد مبتلا به RA، NOs2 mRNA و پروتئین آن را بیان کرده و نیتریک اکساید را در حالت آزمایشگاهی تولید می‌کنند[۵-۲].

امروزه، از داروهای گوناگون برای درمان RA و Juvenile Rheumatoid Arthritis استفاده می‌شود، که عبارت هستند از: داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی، شامل جلوگیری‌کننده‌های نوین انتخابی سیکلوکسیژناز ۲ (cox-2)، گلوکوکورتیکوئیدها در میزان های پایین به صورت روزانه، داروهای DMARDs (Disease Modifying Antirheumatics) مانند کلروکوئین، طلا، سولفاسالازین، متوترکسات و داروهای سرکوب کننده ی ایمنی، مانند آزاتیوپرین، سیکلوسپورین A و سیکلوفسفامید و عوامل زیست شناختی که اثر جلوگیری کننده بر روی TNF-α دارند، شامل Infliximab، Etanercept و IL-2 [۶].

با توجه به این که، در خط دوم درمان بیماری RA و JRA، از داروهای متوترکسات، سولفاسالازین، آزاتیوپرین و کلروکوئین استفاده می شود و با توجه به نقش نیتریک اکساید در بیماری آرتریت روماتوئید، در این پژوهش به بررسی اثر داروهای یاد شده بر تولید نیتریک اکساید و نیز تفاوت میان میزان های گوناگون این داروها با یکدیگر بر روی تولید نیتریک اکساید پرداخته شده است، که می‌تواند یکی از ساز و کارهای عمل این داروها در روند بهبود بیماری باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش

ماکـروفاژهای جـدا شده از صفاق موش Balb/C شـش تا هشت هفته ای ماده، پس از شست و شو، شـمارش و بـا تریـپان بلـو درصـــد زنـده بـودن سـلول هـا تعییـن گـردید. سـپس به شمار ^{5} ۱۰*۳ cell/well در پلیت های ۹۶ خانه‌ای در مجاورت LPS (۱۰μg/ml)، IFN-γ (۱۰۰ IU/ml) و مـیزان های گوناگون (۱۰۰۰-۱ μM) از داروهای متوترکســات، سولفــاســالازین، آزاتیوپـریـــن و کلــروکوئین در محــیط کــشت RPMI 1640 دارای ۱۰ درصـــد FCS و ۱۰۰ IU/ml پنـــی‌ســـیلین و ۱۰۰ μg/ml استرپتومایســـین (Sigma) کشـت داده شـدند. پس از ٤٨ ساعت، سـوپرناتانت سـلولی گـردآوری گردید و در فریزر منفـی ۲۰ درجـه سـانتی گراد تا زمان اندازه گیری نیتریک اکساید نگهداری گردید.

برای اندازه گیری میزان نیتریک اکساید، میزان نیتریت که معرف میزان تولید نیتریک اکساید است و در حقیقت فراورده ی پایدار نیتریک اکساید است، با استفاده از روش گریس (Griess) اندازه‌گیری گردید[۷]. به این منظور، محلول ۱ درصد از N-Naphtyl Ethylen Dihydrochloride (Sigma) و محلول ۱ درصد از Sulfanilamide (Sigma) با یکدیگر مخلوط شده و به سوپرناتانت سلولی افزوده گردید. سپس، با استفاده از ELISA Reader در طول موج ٥٤٠ نانومتر، میزان نیتریت خوانده شد. آنالیز آماری با استفاده از آزمون من- ویتنی (Mann Whitney) انجام گرفت.

یافته ها

همـان گونه که در جدول ۱ آمده است، آزاتیوپرین در همـه میزان های استفاده شده (۱۰۰۰-۱ μM) باعـث کـــاهش معنـی دار آمـــاری تولید نیتریک اکسـاید، بـه وسیله ی ماکروفاژهای صفاقی گردید، کـه ایـن اثـر، وابسته به میزان دارو بود ($p<۰/۰۵$). کلروکوئیـن در همـه ی میزان ها (۱۰۰۰-۱ μM) باعـث کـاهش مـیزان نیـتریک اکسـاید تولید شده گـــردید، کـــه بجـــز مـــیزان ۱ μM، در دیگـــر میزان ها، این کاهش در مقایسه با چاهک کنترل، از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$).

سولفاسـالازین در همـه مـیزان هـا (۱۰۰۰-۱ μM) در مقایسـه بـا چاهک کنترل، باعث کاهش مـیزان تولـید نیتریک اکساید به وسیله ی ماکروفاژ گـردید، کـه بجـز میزان ۱μM، در دیگر میزان ها، کـاهش تولـید نیـتریک اکسـاید از نظـر آمـاری معنـی دار بود ($p<۰/۰۵$). برخلاف دیگر داروهای اسـتفاده شـده در این بررسی، متوترکسات، تنها در میزان ۱۰۰۰ μM در مقایسه با چاهک کنترل باعث کـاهش معنی‌دار آماری میزان نیتریک اکساید تولید شده گردید ($p<۰/۰۵$) و در دیگر میزان ها، کاهش بسـیار اندک را در میزان نیتریک اکساید تولید شده باعـث گـردید، کـه از نظر آماری معنی‌دار نبود. در مقایسه ی میان اثر میزان های گوناگون استفاده شده از متوترکسات، سولفاسالازین، کلروکوئین و

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: اثر میزان های گوناگون (۱۰۰۰-۱μM) از داروهای آزاتیوپرین، کلروکوئین، سولفاسالازین و متوترکسات بر تولید نیتریک اکساید در ماکروفاژهای صفاقی موش

غلظت / دارو	۱ (μM)	۱۰ (μM)	۱۰۰ (μM)	۱۰۰۰ (μM)	تولید نیتریک اکساید (nmoL / well)
آزاتیوپرین	۳۵/۷± ۴/۳	۲۹/۰± ۳/۹	۱۹/۲ ± ۲/۱	۸/۹ ±۰/۸	
کلروکویین	۴۰/۲ ± ۴/۱	۳۱/۲± ۳/۸	۲۰/۵ ± ۲/۳	۱۵/۶ ± ۱/۱	
سولفاسالازین	۴۲/۴ ± ۴/۳	۳۷/۹± ۴	۲۸/۱ ± ۲/۲	۱۶/۹ ± ۱/۶	
متوترکسات	۴۲/۸ ± ۴/۲	۴۲/۴ ± ۳/۹	۲۴/۴ ± ۳/۲	۳۵/۷ ± ۲/۴	
کنترل	۴۴/۶ ±۴/۳				

آزاتیوپرین، بر کاهش نیتریک اکساید، با یکدیگر، مشاهده گردیده که در میزان ۱ μM، آزاتیوپرین بیشتر از دیگر داروها باعث کاهش تولید نیتریک اکساید گردیده، که این کاهش، در مقایسه با کاهش مشاهده شده در همین میزان با استفاده از سولفاسالازین و متوترکسات، اختلاف معنی دار آماری را نشان می‌دهد (p<۰/۰۵)، اما با کلروکوئین در این میزان، اختلاف معنی دار آماری ندارد و میان کلروکوئین، سولفاسالازین و متوترکسات، اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد (جدول ۱). در میزان ۱۰μM و ۱۰۰ μM، آزاتیوپرین در مقایسه با سولفاسالازین، متوترکسات و کلروکوئین باعث کاهش بیشتر در تولید نیتریک اکساید گردید، که این اختلاف، از نظر آماری معنی دار بود (p<۰/۰۵). در این دو میزان، میان کلروکوئین و آزاتیوپرین اختلاف معنی دار آماری مشاهده نگردید، اما اختلاف معنی دار آماری میان سولفاسالازین و کلروکوئین و نیز متوترکسات و سولفاسالازین در میزان های ۱۰μM و ۱۰۰ μM دیده شد (جدول ۱).

در میزان ۱۰۰۰μM، بیشترین کاهش در میزان تولید نیتریک اکساید، به وسیله ی آزاتیوپرین مشاهده شد، که در این میزان، اختلاف معنی دار آماری میان آزاتیوپرین با کلروکوئین، سولفاسالازین و متوترکسات دیده شد(p<۰/۰۵) و میان کلروکوئین و سولفاسالازین، اختلاف معنی دار آماری مشاهده نگردید، اما متوترکسات با داروهای دیگر در این میزان اختلاف معنی دار آماری نشان داد (p<۰/۰۵۰) (جدول ۱).

بحث

در این پژوهش، اثر داروهای متوترکسات، سولفاسالازین، کلروکوئین و آزاتیوپرین بر تولید نیتریک اکساید در ماکروفاژهای پریتونیوم موش Balb/C بررسی گردید. این یافته ها، نشان می دهد، که سولفاسالازین باعث سرکوب تولید

www.SID.ir

Archive of SID

نیتریک اکساید می گردد و با توجه به آن که، نقش پاتوفیزیولوژیک نیتریک اکساید در آرتریت روماتوئید تایید شده است [۸،۹]، ممکن است یکی از اثرات درمانی سولفاسالازین در آرتریت روماتوئید، سرکوب تولید نیتریک اکساید به وسیله ی ماکروفاژها باشد. در پژوهشی که به وسیله ی آیکو (Aiko) و همکارانش [۱۰]، بر روی نقش سولفاسالازین در سرکوب میزان نیتریک اکساید در پلاسمای موش های صحرایی ترانس ژنیک HLA B27 مبتلا به کولیت خود به خود (Spontaneous Colitis) انجام گرفت، اثر جلوگیری کننده ی سولفاسالازین تایید نگردید و یا در پژوهشی که به وسیله ی De Gendt انجام گرفت، مشاهده گردید، که سولفاسالازین بدون اثر جلوگیری کننده بر تولید نیتریک اکساید در کوندروسیت ها ست[۱۱]، که البته می‌توان گفت، که ممکن است اثر سولفاسالازین بر روی نیتریک اکساید یک اثر مختص سلول (Cell Specific) باشد. دربررسی انجام شده به وسیله ی هاسکو (Hasko) و همکارانش، نقش جلوگیری کننده ی سولفاسالازین بر روی نیتریک اکساید در رده ی ماکروفاژی J774 مشاهده گردید[۱۲] و نیز در پژوهش هامالی نن (Hamalainen) و همکارانش، با استفاده از میزان ۱۰۰μM سولفاسالازین، اثرجلوگیری کننده ی دارو بر روی تولید نیتریک اکساید در رده ی ماکروفاژی J774 نشان داده شد،[۱۳] که این بررسی، از یافته های پژوهش کنونی پشتیبانی می‌کند. بر پایه ی یافته‌های هاسکو و همکارانش، مبنی بر این که، سولفاسالازین باعث سرکوب بیان MHC2، iNOs و IL-12 می‌گردد، که همگی به عامل نسخه‌برداری هسته (NF-KB) بستگی دارند[۱۲] و نیز داده های اولیه به دست آمده از پژوهش دیگر، که نشان دهنده ی توانایی سولفاسالازین در جلوگیری از فعال شدن این عامل نسخه برداری است [۱٤]، می توان گفت، که NF-KB یک هدف محتمل برای فعالیت سولفاسالازین است و از این راه، سولفاسالازین باعث سرکوب فعال شدن ماکروفاژ می‌گردد.

در بررسی کنونی نیز متوترکسات در غلظت های ۱۰۰ و۱۰ و ۱ μM به میزان بسیار اندک مانع تولید نیتریک اکساید گردید، که از نظر آماری، این اثر جلوگیری کننده معنی‌دار نبود و تنها در غلظت ۱۰۰۰ μM باعث کاهش معنی دار تولید نیتریک اکساید در ماکروفاژهای به دست آمده از صفاق موش گردید ($p<۰/۰۵$). در بررسی انجام شده به وسیله ی اوماتا (Omata) و همکارانش، مشاهده گردید، که متوترکسات در غلظت های ۱۰-۱ μM و در حضور LPS نتوانست باعث کاهش معنی دار آماری تولید نیتریک اکساید در ماکروفاژهای به دست آمده از صفاق موش صحرایی گردد[۱۵].

همچنین، در بررسی انجام شده به وسیله ی هامالی نن و همکارانش، غلظت ۱۰۰ μM از متوترکسات نتوانست باعث کاهش معنی دار آماری

www.SID.ir

Archive of SID

تولید نیتریک اکساید در رده ی ماکروفاژی J774 گردد، که یافته های به دست آمده در این دو بررسی از یافته های بررسی کنونی پشتیبانی می کنند.

از سویی، در بررسی کنونی، متوترکسات در غلظت ۱۰۰۰ μM باعث کاهش معنی دار آماری تولید نیتریک اکساید گردید. در بررسی انجام شده به وسیله ی آلدرتون(Alderton) و همکارانش، مشاهده گردید، که متوترکسات مانع احیای دی هیدروفولات به تتراهیدروفولات می‌شود، که این ماده برای تولید تتراهیدروبیوپترین، که یک کوفاکتوربرای iNOs است، لازم می‌باشد [۱۶]. بنابراین، ممکن است اثر جلوگیری کننده ی متوترکسات بر تولید نیتریک اکساید در غلظت ۱۰۰۰ μM از راه این ساز و کار انجام گرفته باشد.

داروی دیگر مورد مطالعه در این بررسی، کلروکوئین بود، که یک داروی ضدمالاریا است و از آن، در درمان آرتریت روماتوئید نیز استفاده می‌شود[۱۷]. در بررسی کنونی، نشان داده شد، که در غلظت های ۱۰۰۰-۱μM، کلروکوئین باعث کاهش معنی دار آماری تولید نیتریک اکساید در صفاق موش می شود. هرابک (Hraback) وهمکارانش، اثر میزان های ۱۰-۱ μM از کلروکوئین بر کاهش معنی‌دار تولید نیتریک اکساید را نشان دادند [۱۸]، که از یافته‌های به دست آمده در این بررسی پشتیبانی می کند. همچنین، در پژوهش کنونی، این اثر جلوگیری کننده، حتی تا میزان ۱۰۰۰μM نیز مشاهده گردید، که از نظر آماری، نیز معنی دار بود (p<۰/۰۵). ساز و کار اثر کلروکوئین، ممکن است به دلیل جلوگیری از تولید iNOs باشد[۱۸].

در این بررسی، آزاتیوپرین در میزان های ۱۰۰۰ μM، باعث کاهش معنی دار آماری تولید نیتریک اکساید در مقایسه با چاهک کنترل گردید (p<۰/۰۵)، هر چند که اختلاف میان کاهش تولید نیتریک اکساید در میزان های استفاده شده به وسیله ی آزاتیوپرین و کلروکوئین با یکدیگر تفاوت معنی‌دار آماری نشان ندادند. همچنین، کاهش تولید نیتریک اکساید به وسیله ی میزان های گوناگون سولفاسالازین در مقایسه با میزان های گوناگون کلروکوئین و آزاتیوپرین کمتر بود و این اختلاف، از نظر آماری معنی‌دار بود (p<۰/۰۵). همچنین، میزان های گوناگون متوترکسات در مقایسه با میزان های استفاده شده به وسیله ی داروهای دیگر، در همه میزان ها، کاهشی کمتر در میزان تولید نیتریک اکساید ایجاد کرد.

نتیجه گیری

آزاتیوپرین و کلروکوئین، بیشترین اثر را در کاهش تولید نیتریک اکساید در ماکروفاژهای به دست آمده از موش داشتند و پس از آن، سولفاسالازین و متوترکسات قرار داشتند. بنابراین، بنظر می رسد که یکی از ساز و کار های اثر داروهای بالا بر روند بهبود بیماری آرتریت روماتوئید، کاهش تولید نیتریک اکساید است.

www.SID.ir

Archive of SID

A Study of the Effect of Drugs Used in the Treatment of Rheumatoid Arthritis on Nitric Oxide Production of Peritoneal Macrophages in Balb/C Mice

Background: Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic progressive inflammatory disorder characterized by polyarthritis in association with various systemic symptoms. Nitric oxide (NO) production is increased in serum and synovial fluid of rheumatoid arthritis patients and may be involved in the inflammatory process. The aim of the present study was to assess the effect of various drugs used in the treatment of RA on NO production and if this effect varies with respect to the drugs that were tested. **Materials and Methods:** Different doses (1-1000 μM) of methotrexate, sulfasalazine, chloroquine and azathioprine were administered to measure IFN-γ and LPS-induced NO production in peritoneal macrophages of Balb/C mice. NO production was measured by Griess reaction. **Results:** Azathioprine, chloroquine and sulfasalazine inhibited NO production in a dose-dependent manner. Azathioprine reduced NO production at all drug concentrations ($p<0.05$). Chloroquine and sulfasalazine reduced NO production when given at 10-1000μM concentrations ($p<0.05$), but methotrexate reduced NO production ($p<0.05$) only when given at a high (1000μM) concentration. **Conclusion:** The results suggest that, NO inhibition by these drugs can be regarded as a mechanism of action of these medications in the treatment of RA.

R. Amin, M.D.,*
*E. Aliabadi Ph.D. **,*
*S. Kashef M.D.**
** Associate Professor of Pediatrics,*
*** Assistant Professor of Immunology and Allergy,*
Shiraz University of Medical Sciences,
Shiraz, Iran

Correspondence:
R. Amin
Department of Pediatrics,
Nemazee Hospital,
Shiraz, Iran
Tel:*+98-711-6265024*

www.SID.ir

Archive of SID

Keywords: Rheumatoid arthritis, Sulfasalazine, Chloroquine, Azathioprine, Methotrexate, Nitric oxide

منابع

[1]Borderi D, Hilliquin P, Hernavann A, et al.: Nitric oxide synthase is expressed in the lymphonuclear cells of synovial fluid in patients with rheumatiod arthritis**.** ***J Rheumatol*** 1999;26:83-8.
[2]Farrella A, Blake RD, Palmer MR: Increased concentration of nitrite in synovial fluid and serum samples suggests increased nitric oxide synthesis in rheumatiod arthritis. ***Ann Rheum Dis*** 1996;51:1219-22.
[3]Sakuari H, Kohsaka H, Liu MF, et al.: Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. ***J Clin Invest*** 1995;96:2357-63.
[4]Stadler J, Stefanovic RM, Billiar TR, et al.: Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharides. ***J Immunol*** 1991;147:3915-20.
[5]Stefanovic-Racic M, Stadler J, Evans CH: Nitric oxide production by cytokine stimulated synovial fibroblast. ***Trans Orthop Res Soc*** 1992;17:2222-34.
[6]Stefannovic-Racic M, Stadler J, Evans CH: Nitric oxide and arthritis. ***Arthritis Rheum*** 1993;36:1036-44.
[7]James SL, Glaven J: Macrophage cytotoxicity against *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. ***J Immunol*** 1989;143(12):4208-12.
[8]Mc Cartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE: Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. ***J Exp Med*** 1993;178(2):749-54.
[9]Szabo C, Virag L, Cuzzocreas, et al.: Protection against peroxynitrite-induced fibroblast injury and arthritis development by inhibition of poly ADP-ribose synthase. ***Proc Natl Acad Sci*** 1998;95:3867-72.
[10]Aiko S, Fuseler J, Grisham MB: Effects of nitric oxide synthase inhibition or sulfasalazine on the spontaneous colitis observed in HLA B27 transgenic rats. ***J Pharmacol Exp Ther*** 1998;284:722-7.
[11]De Gendt CM, De Clerck LS, Bridts CH, et al.: Influence of antirheumatic drugs on nitric oxide and IL-8 production in human articular chondrocytes. ***J Rheumatol*** 1998;25:536-38.
[12]Hasko G, Szabo C, Nemath H: Sulfasalazine inhibits macrophage activation: Inhibitory effects on IL-12 production and major histocompatability complex II expression. ***Immunology*** 2001;103:473-78.
[13]Hamalainen M, Lahti A, Moilanen E: Calcineurin inhibitors, cylosporine A and tacrolimus inhibit expression of inducible nitric oxide synthase in colon epithelial and macrophage cell lines. ***Eur J Pharmacol*** 2002;448:239-44.
[14]Wahl C, Liptay S, Adler G, et al.: Sulfasalazine, a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa. ***J Clin Invest*** 1998;101:1163-74.
[15]Omata T, Segawa Y, Inoue N, et al.: Methotrexate suppresses nitric oxide production ex vivo in macrophages from rats with adjuvant-induced arthritis. ***Res Exp Med*** 1997;197:81-90.
[16] Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG: Nitric oxide synthases: Structure, function, and inhibition. ***Biochem J*** 2001;357:593-615.
[17]Wellems TE: Malaria. How chloroquine works. ***Nature*** 1992;355:108-9.
[18]Hrabak A, Sefrioui H, Verciuyesse V, et al.: Action of chloroquine on nitric oxide production and parasite killing by macrophages. ***Eur J Pharmacol*** 1998;354:83-90.

www.SID.ir