

TARTU ÜLIKOOL
ARSTITEADUSKOND
FÜSIOLOOGIA INSTITUUT

DMITRI TEPERIK

**Immuunmodulaatorite mõju NO sünteesile ja L-arginiini transpordile RAW 264.7
makrofaagides**

Magistritöö

Juhendaja: Vallo Volke, MD, PhD

**TARTU
2007**

SISUKORD

TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID	4
1. SISSEJUHATUS	5
2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
2.1. Lämmastikmonooksiid.....	6
2.1.1. NO biosüntees	6
2.1.2. L-arginiini transport ja metabolism	9
2.1.3. NO toimemehhanismid	10
2.1.4. NO rollid vaskulaar- ja närvisüsteemis.....	12
2.1.5. NO roll immuunsüsteemis	13
2.2. Immuunmoduleerivad ravimid ja NO süntees	17
2.2.1. Glükokortikoidid.....	18
2.2.2. Tetratsükliin	19
2.2.3. Kaltsineuriini inhibiitorid.....	20
3. TÖÖ EESMÄRGID	22
4. MATERJALID ja METOODIKA	23
4.1. Rakukultuur ja kemikaalid	23
4.2. Töös rakendatud meetodid	24
4.2.1. Rakkude eluvõimelisuse määramine.....	24
4.2.2. NO sünteesi mõõtmine.....	24
4.2.3. L-arginiini transpordi mõõtmine.....	25
4.2.4. Üldvalgu hulga määramine	25
4.2.5. Andmete statistiline töötlus.....	26
5. TULEMUSED	27
5.1. Uuritavate ainete toime makrofaagide eluvõimelisusele	27
5.2. Immuunmodulaatorite toime LPS-indutseeritud NO sünteesile	28
5.3. Uuritavate ainete toime L-arginiini transpordile rakkudesse.....	31
6. ARUTELU	33
6.1. Immuunmodulaatorite toime rakkude eluvõimelisusele.....	33
6.2. Immuunmodulaatorite toime LPS-indutseeritud NO sünteesile ja L-arginiini transpordile	33
6.2.1. Kaltsineuriini inhibiitorite efektid.....	34
6.2.2. Deksametasooni efektid	36

6.2.3. Tetratsükliini efektid	37
6.3. Kokkuvõte	38
7. JÄRELDUSED	39
8. KIRJANDUS	40
9. SUMMARY IN ENGLISH	53
TÄNUAVALDUSED	54

TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID

ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosiintrifosfaat
CAT	Katioonsete aminohapete transporter
COX-2	Tsüklooksügenaas-2
DNA	Desoksüribonekleinhape
DME	<i>Dulbecco's Modified Eagle</i> sööde
GABA	Gamma-aminovõihape
GMP	Guanosiinmonofosfaat
Ig	Immuunglobuliin
IL	Interleukiin
INF- γ	Interferoon gamma
LPS	Lipopolüsahhariid
MnSOD	Mangaani sisaldav superoksiidi dismutaas
NADH	Redutseeritud nikotiinamid-adeniindinukleotiid
NF- κ B	Tuumafaktor kappa B
NO	Lämmastikmonooksiid
NOS	Lämmastikmonooksiidi süntaas
OD	Optiline tihedus
PARS	Polü(ADP-riboos)-süntaas
Th1	T-helper-1 rakud
Th2	T-helper-2 rakud
TLR	Tollilaadsed retseptorid
TNF	Tuumori nekroosifaktor
VEGF	Vaskulaarse endoteeli kasvufaktor

1. SISSEJUHATUS

Koekahjustuse korral käivitab organism terve rea erinevaid reaktsioone, mida vallandavad ja reguleerivad molekulid pärinevad nii kahjustatud rakkudest kui immuunrakkudest. Selliste reaktsioonide kompleks viib põletikuni, mille peaeesmärgiks on kõrvaldada põletikulise protsessi bioloogilist, keemilist või füüsikalist põhjust ning regenereerida kahjustatud kude. Põletikuprotsessis osalevate rakkude hulgas paistavad eriti silma mitmeid mediaatormolekule sünteesivad makrofaagid. Üheks üldtuntud signaalmolekuliks, mida aktiveeritud makrofaagid toodavad, on L-arginiinist sünteesitav lämmastikmonooksiid (NO). Nii vees kui lipiidides lahustuva molekulina osaleb NO erinevates füsioloogilistes ja patofüsioloogilistes protsessides üle terve inimkeha.

NO võidukäigu alguseks võib pidada 1987. aastat, mil ajakirjas Nature ilmunud artikkel tutvustas lämmastikmonooksiidi kui endoteeli sünteesitud bioloogiliselt aktiivset lihaseid lõõgastavat faktorit [2]. 1990. aastal avastasid Bredt ja Snyder NO molekuli ka närvirakkudes [3]. Nüüdseks on teada, et NO-d sünteesitakse organismis kolme erineva ensüümi poolt, millest kaks on konstitutiivse olemusega. Kolmas, indutseeritav lämmastikmonooksiidi süntaas (iNOS) kirjeldati 1992. aastal ning pakkus uue lähenemise NO toimele aktiveeritud makrofaagides [4]. Järgnenud kümnekonna aasta jooksul on uuritud lämmastikmonooksiidi funktsioone ja selle sünteesi eest vastutavad ensüüme eri vaatenurkadest, tuues muuhulgas tasapisi selgust NO seotusesse immuunfüsioloogiliste ja -patoloogiliste protsessidega. Üheks paljutõotavaks uurimissuunaks on erinevate ainete (sh stimulaatorite, inhibiitorite ja ravimite) mõju indutseeritavale NO süntaasile ning L-arginiini biosünteesi radadele.

Käesoleva uurimistöö kavandamisel ja tegemisel lähtuti eesmärgist uurida erinevate immuunsupressantide mõju lämmastikmonooksiidi sünteesile ja L-arginiini transpordile hiire makrofaagides. Töö käigus saavutatud tulemused on üldises kooskõlas vastavate teaduskirjanduses levinud seisukohtadega ning pakuvad lisainfot juba kasutusel olevate ravimite võimalike mõjude kohta. Uurimistöö lisaväärtuseks võib pidada ka hiire makrofaagi mudelsüsteemi täiustamist tulevaste ravimkatsete tarvis.

2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

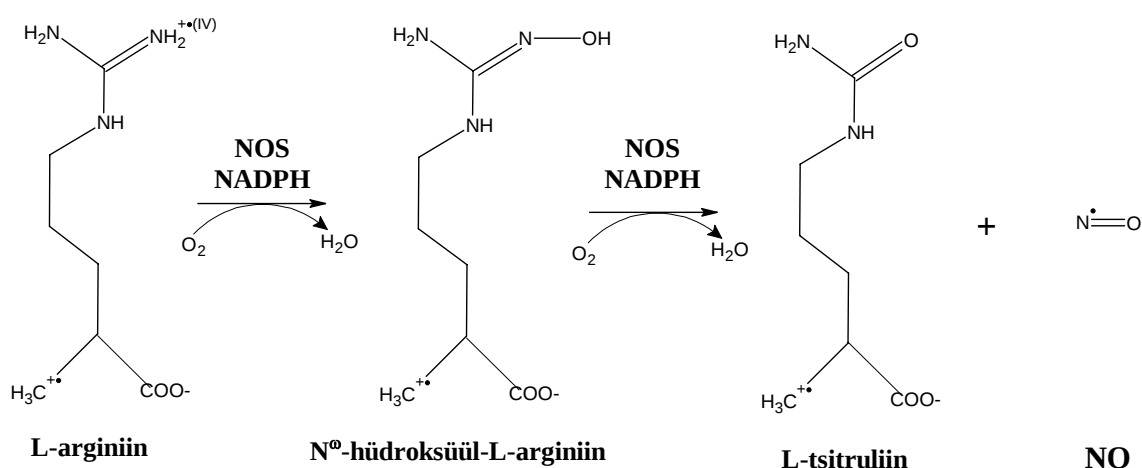
2.1. Lämmastikmonooksiid

Lämmastikmonooksiid (NO) on suhteliselt hiljuti avastatud mittekonventsionaalne mediaator organismis. Tegu on gaasiga, mis lahustub vedelikes ja läbib vabalt rakumembraane. Seetõttu pole NO-d võimalik rakus säilitada ja see levib koes laiemalt, kui traditsioonilised mediaatorid. NO keskmine eluiga elusorganismis arvatakse piirduvat paarikümne sekundiga, sõltudes eelkõige NO kontsentratsioonist ja keemilisest keskkonnast [5].

2.1.1. NO biosüntees

NO süntees eukarüootsete rakkude poolt avastati esimesena hiire makrofaagidel [4]. NO sünteesi on leitud lindudel [6], roomajatel ja kaladel [7], molluskitel [8], putukatel [9,10], ainuraksetel [11,12] ja limaseentel [13]. Lai evolutsiooniline levik näitab NO tähtsat rolli nii kaitse- kui regulatiivse molekulina.

NO-d sünteesitakse L-arginiinist NO süntaasi (NOS) poolt, reaktsiooni käik on toodud joonisel 1.



Joonis 1. NO süntees L-arginiinist.

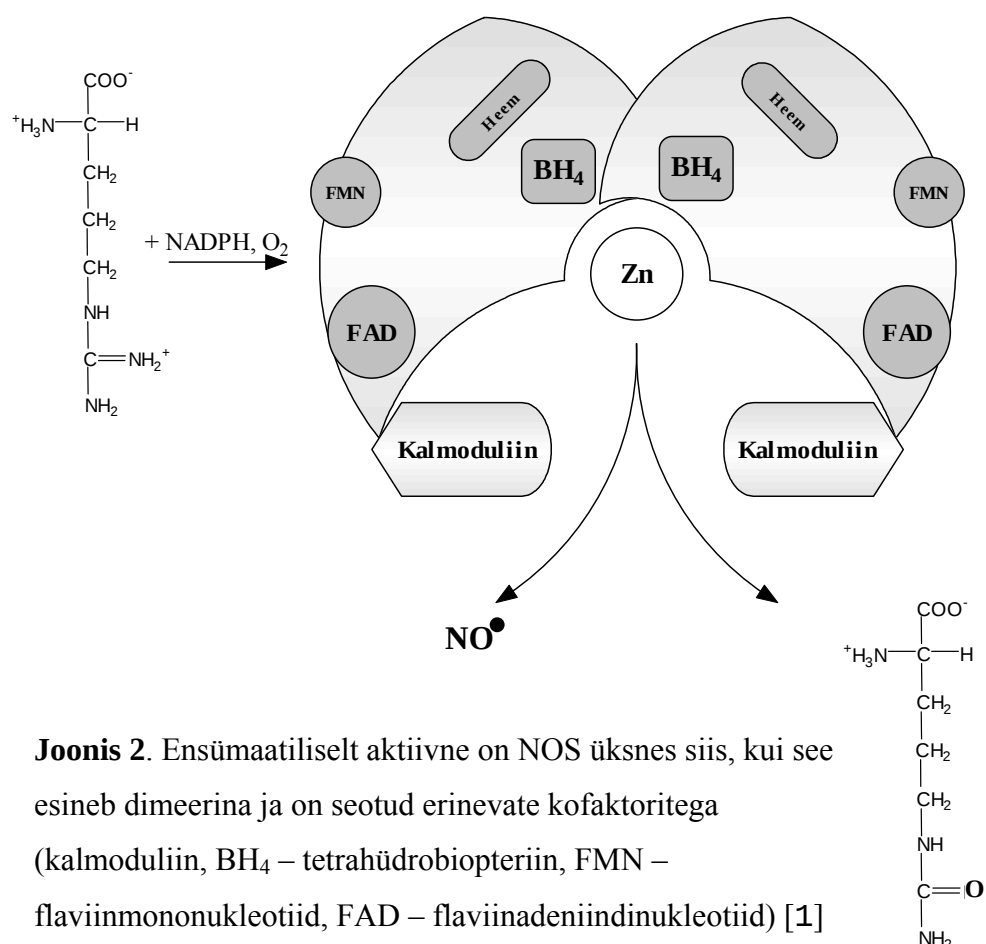
NO süntaasil on vähemalt kolm isoensüümi: neuronaalne, endoteliaalne ja indutseeritav NOS. Isovormid on kodeeritud erinevate geenide poolt, kuid nende aminohappelised järjestused on liigisisese homoloogsed 51-57% ulatuses [14] ning erinevatel liikidel sama isoensüümi osas kuni 90% ulatuses [15]. NOS-i isoensüümide tähtsamad omadused on toodud tabelis 1. Kuigi ensüümid on evolutsiooniliselt suhteliselt konserveerunud, esinevad liikidevahelised erinevused, mida tuleb uurimistulemuste interpreteerimisel arvesse võtta [16].

Tabel 1. NO süntaasi isovormid [17,18]

	Neuronaalne (nNOS)	Indutseeritav (iNOS)	Endoteliaalne (eNOS)
Esmalt avastatud	närvirakud	makrofaagid	endoteel
Leidub ka	müotsüüdid, astrotsüüdid	astrotsüüdid, mikroglia	närvirakud
Paiknemine rakus	tsütoplasmas või membraaniga seotud	tsütoplasmas või membraaniga seotud	enamasti membraaniga seotud
Aktiivsuse sõltuvus kaltsiumist	jah	ei	jah
Süntees	peamiselt püsiv	indutseeritav	peamiselt püsiv
Vabastatava NO kogus	väike	suur	väike
Võimalik funktsioon	regulatsioon	kaitse, regulatsioon	regulatsioon
Aktiveerijad	glutamaat	lipopolüsahhariidid	atsetüülkoliin, venitus

Neuronaalset ja endoteliaalset NOS-i ekspresseeritakse rakus konstitutiivselt ja nende aktiivsus on tihedalt seotud rakusisese kaltsiumiiooni kontsentratsiooniga. Indutseeritavat NOS-i ekspresseeritakse peamiselt aktivatsioonijärgselt ning see ensüüm ei sõltu Ca^{2+} kontsentratsioonist. Kõik kolm isovormi on aktiivsed üksnes dimeerina ja seostununa kalmoduliiniga. Erinevalt eNOS-ist ja nNOS-ist, on kalmoduliin iNOS-iga seotud püsivalt, mistõttu kaltsium ei mõjuta iNOS-i aktiivsust selle tegevust [19]. Samas on näidatud, et iNOS-i aktiveerimine makrofaagides sõltub kaaliumikanalite aktivatsioonist [20].

NO süntaasi molekulil esineb ka teisi kofaktorite seostumiskohti (joonis 2). Teaduskirjanduses kirjeldatakse NO süntaasi kui kahedomäänset struktuuri: oksügenaasne domään paikneb aminoterminaalsel poolel ja reduktaasne domään – karboksüterminaalsel poolel. Viimasest on umbes 40% aminohapetest identsed tsütokroom P450 reduktaasi aminohapetega [21,22].



Joonis 2. Ensümaatiliselt aktiivne on NOS üksnes siis, kui see esineb dimeerina ja on seotud erinevate kofaktoritega (kalmoduliin, BH₄ – tetrahüdriopteriin, FMN – flaviinmononukleotiid, FAD – flaviinadeniindinukleotiid) [1]

NO sünteesi reaktsioonid on kolme isovormi puhul identsed, kuid selle protsessi regulatsioonis esineb märkimisväärsed erinevusi. Kuigi eNOS-i ja nNOS-i nimetatakse konstitutiivseteks isovormideks, reguleeritakse ka nende ekspressioonitaset rakus. Hiljuti leiti, et nNOS-i ekspressioon on reguleeritud nt neuronaaalse aktiivsuse, steroidhormoonide ja põletikuliste tsütokiinide poolt. eNOS-i ekspressiooni mõjutavad nt surve veresoonte seinal, kasvufaktorid, hüpoksia ja tuumori nekroosifaktor α (TNF- α) [23].

eNOS ja nNOS avastati esmalt vastavalt endoteelist ja närvirakkudest, kuid mõlemaid ekspresseeritakse ka mitmetes teistes kudedes. Üldistades võib öelda, et NO pidev väikestes kogustes tootmine kahe konstitutiivse isovormi poolt osaleb organismi füsioloogilistes

protsessides, ennekõike kardiovaskulaar- ja närvisüsteemis. Samas iNOSi poolt toodetud NO mikromolaarses kontsentratsioonis on iseloomulik põletikulistele protsessidele ja infektsioonidele, ning omab nii regulatiivset kui toksilist toimet.

2.1.2. L-arginiini transport ja metabolism

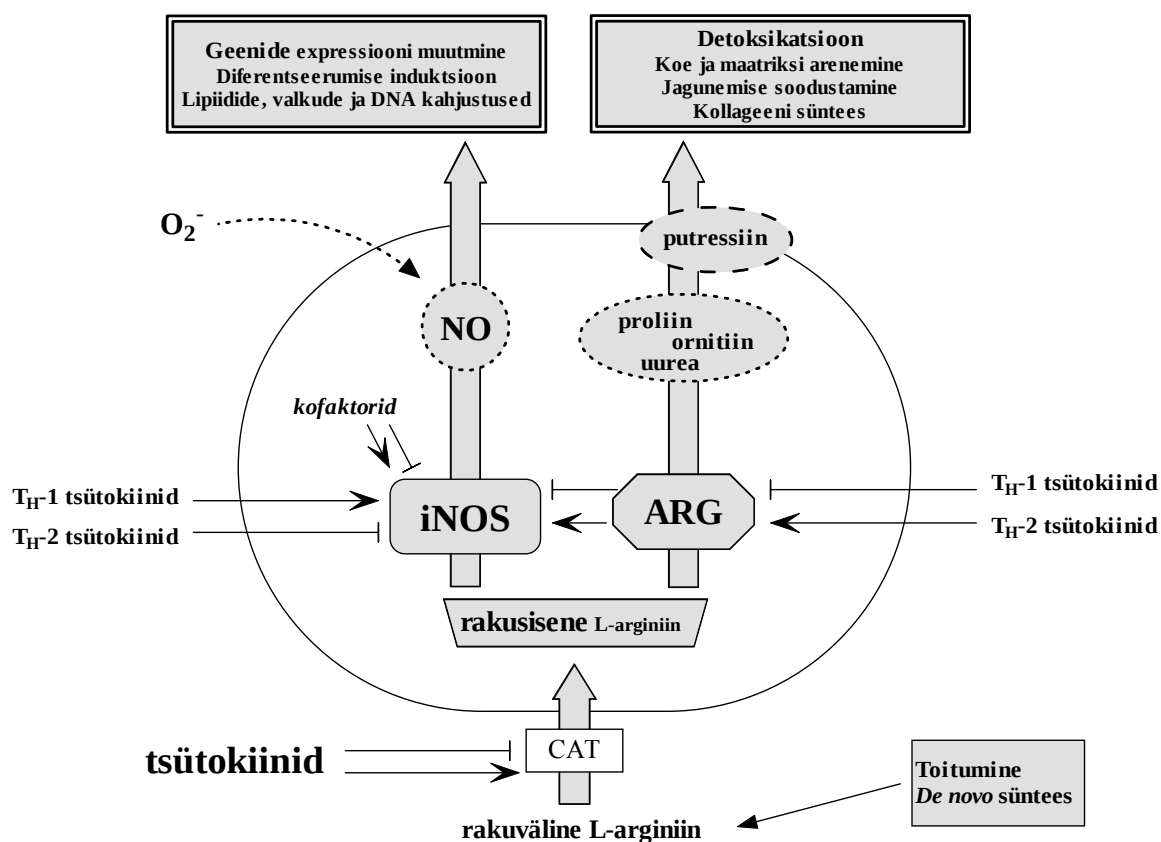
Üheks väga oluliseks NO sünteesi tingimuseks on L-arginiini olemasolu ja selle kättesaadavus. Siin on tähtsamateks protsessideks L-arginiini transport rakku ja selle metaboliseerimine konkureerivate ensüümide poolt (joonis 3). On võimalik ka arginiini *de novo* süntees tsitrulliinist kahe ensüümi – arginiinsuksinaadi süntetaasi ning arginiinsuksinaadi lüaasi – toimet. Arvatakse, et sellisel viisil saadakse siiski vaid väike hulk (5-15%) endogeensest arginiinist [24]. Kõrgematel loomadel koondub arginiini *de novo* süntees eelkõige maksa ja neerudesse [25]. Huvitav on märkida, et mõned patogeensed bakterid (nt *Helicobacter pylori*) ja parasiidid (nt *Leishmania* spp.) kasutavad arginiini ammendamist enda ellujäämisstrateegiana – substraadi puudumisel ei toodeta antimikroobset NO-d [26,27]. Veres tsirkuleerivat L-arginiini transporditakse rakku katioonsete aminohapete transporterite (CAT) kaudu. Mitmetes rakutüüpides on leitud iNOS-i stimuleerimisega paralleelselt toimuv CAT transporterite sünteesi indutseerimine [28].

Oluline on ka L-arginiini kasutamine teiste ensüümide poolt. Arginiini kasutavad substraadina veel arginaasid ja võimalik, et ka arginiini dekarboksülaas. Need ensüümid võivad muuta NOS-i aktiivsust nii konkureerides substraadi pärast kui ka teiste mehhanismide kaudu.

Arginaasil on kaks isovormi. Kuigi mõlemad katalüüsivad arginiini muundumist ornitiiniks ja uureaks, erinevad need rakusisese lokaliseerumise ja biokeemiliste omaduste poolest. Ensüümid on kodeeritud erinevate geenide poolt ja nende aminohappelised järjestused on 58% ulatuses identsed. Arginaas I lokaliseerub tsütosoolis ja selle aktiivsus on suurim maksas; arginaas II asetseb mitokondrites, ja selle aktiivsus on suurem neerudes [29].

T-helper-2 (Th2) rakkude poolt sünteesitud tsütokiinid (interleukiin 4 (IL-4), IL-13 jt) indutseerivad arginaas I tegevust, inhibeerides samal ajal iNOS-i. Interferoon γ (IFN- γ) toimib vastupidiselt, indutseerides iNOS-i tegevust ja surudes maha arginaas I. Veelgi huvitavam on asjaolu, et hiire makrofaagides aktiveeruvad mõlemad ensüümid vastusena LPS-le [30].

Ka iNOS võib reguleerida arginaaside aktiivsust. Näiteks inhibeerib iNOS-i poolt sünteesitav $\text{N}^{\text{G}}\text{-OH-L-arginiin}$ arginaasi [31].



Joonis 3. L-arginiini transport ja metaboliseerivad ensüümid [32]

2.1.3. NO toimemehhanismid

Kuigi lämmastikmonooksiidil on palju erinevaid molekulaarseid sihtmärke, peetakse üheks olulisemaks guanülaadi tsüklaasi aktiveerimist, mille toimel suureneb cGMP produktsioon [33]. NO on võimeline reageerima nii metallide (nt. heemis) kui ka valkude, nukleiinhapete ja lipiididega.

Tabel 2 võtab kokku NO mõjud mõnele võimalikest rakusisestest märklaudadest.

Huvitav on märkida, et NO ise on võimeline pidurdama NOS-i aktiivsust negatiivse tagasiside printsiibil [34].

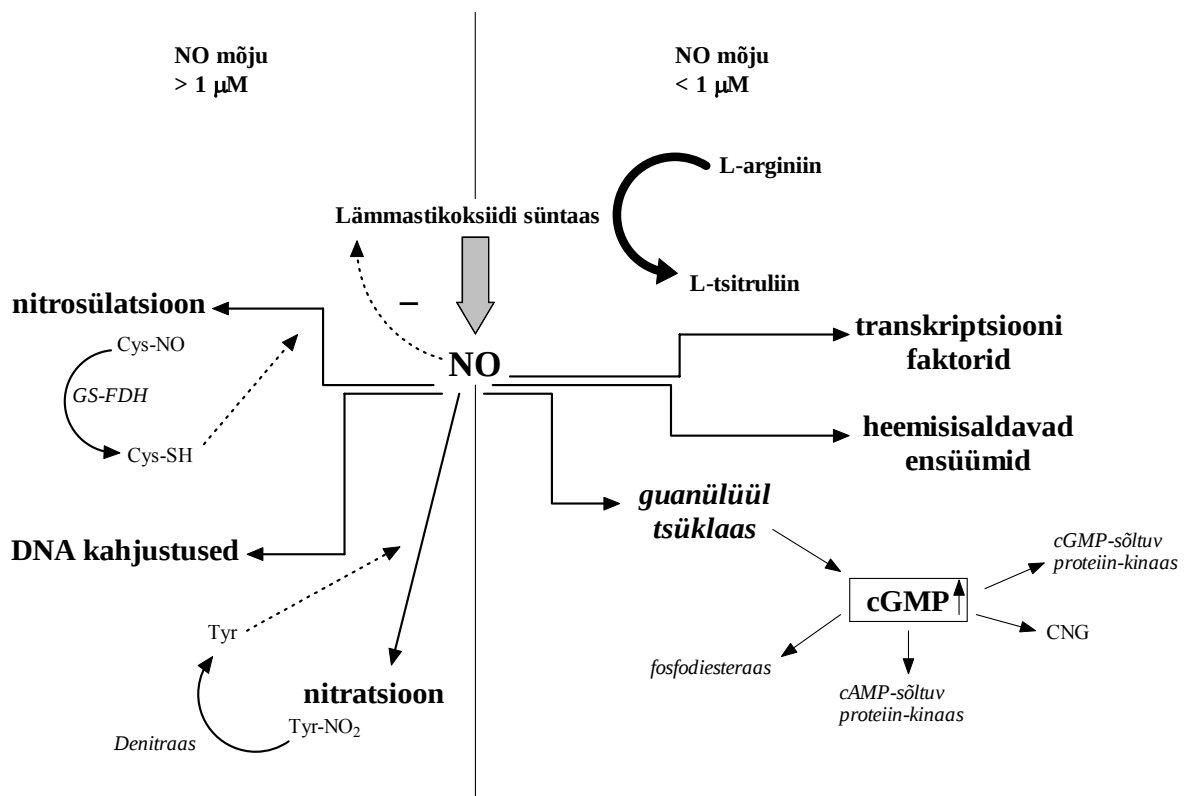
NO on võimeline reageerima hapniku superoksiidiga (O_2^-), mille tagajärjel moodustub võimas oksüdant peroksünitrit (ONOO^-) [35]. Peroksünitrit kahjustab mitokondriaalseid komplekse (I, II, IV ja V) ning mõningaid olulisi ensüüme (nt superoksiidi dismutaas). Olgu

mainitud, et NO reaktsioonid toimuvad mitte-ensümaatilisel teel ja reaktsioonikiirusele avaldab mõju lämmastikmonooksiidi poolestusaeg, mis on pöördsuhteliselt sõltuv NO kontsentratsioonist [5].

Tabel 2. NO sihtmolekulid ja selle mõju võimalikud tagajärjed rakulisel tasemel [33,36]

Molekul	Mõju	Tagajärg
guanülaadi tsüklaas	aktivatsioon (Fe^{2+} heem)	cGMP kontsentratsiooni tõus ja neuroproteksioon
p21 ras	aktivatsioon	rakuvälise signaaliga aktiveeritud proteiinkinaasi aktiveerimine
NADPH-ubikinooni oksidoreduktaas	inhibeerimine	oksüdatiivse fosforüülimise peatamine
NADH-suktsinaadi oksidoreduktaas	inhibeerimine	oksüdatiivse fosforüülimise peatamine
cis-akotinaas	inhibeerimine (Fe-S klaster)	glükolüüsi peatamine
tsütokroomi oküdaas	inhibeerimine	oksüdatiivse fosforüülimise peatamine
kreatiinkinaas	inhibeerimine	ATP kättesaadavuse langus
DNA	DNA ahela kahjustamine	rakukahjustus
hapnik	ONOO ⁻ moodustumine	rakukahjustus

Võimalikud on ka mitmed transnitrosatsioonilised protsessid valkude jm molekulide vahel. Selle puhul vahetavad valgud ja ka teised molekulid NO üksteise vahel, mis võib tagada NO säilimise ja transportimise näiteks stabiilsemate S-nitrosotioolidena, suurendades sellega NO kättesaadavust ning mõju. Just tänu transnitrosatsioonile siseneb NO rakutuumas, kus mõjutab transkriptsiooni faktoreid ning võib interakteeruda DNAGA [37]. Seda protsessi loetakse peamiseks aluseks NO mõjule kasvaja progressioonil [38]. Kokkuvõtvalt võib öelda, et NO toime sõltub kontsentratsioonist, reguleerides mitmesuguseid füsioloogilisi protsesse organismis ning suuremates kontsentratsioonides kahjustades nii mitmeid patogeene või ka organismi ennast (joonis 4).



Joonis 4. NO kontsentratsioonist sõltuvad toimed [39]

2.1.4. NO rollid vaskulaar- ja närvisüsteemis

Kardiovaskulaarsüsteemis vastutab NO tootmise eest peamiselt veresoonte endoteeli-rakkudes paiknev eNOS. NO toimib veresoonte silelihastikule lõõgastavalt ning takistab trombotsüütide agregatsiooni. NO mõju veresoonte toonusele on pikka aega uuritud ja praeguseks on teada selle protsessi molekulaarsed mehhanismid, mis põhinevad eelkõige rakusiseste Ca^{2+} ionide väljavoolu pidurdamisel [40]. See takistab kaltsiumi-kalmoduliini ja müosiini kerge ahela kinaasi vahelise kompleksi moodustumist müosiini kerge ahela fosforülatsiooni [41]. Nii farmakoloogiliselt kui ka geeni välja lülitades blokeeritud NO sünteesi tagajärjel toimub vererõhu kõrgenemine, samas kui NO kõrged kontsentratsioonid viivad hüpotensioonile ning osalevad nt septilise šoki kujunemisel [42].

NO inhibeerib vaskulaarsete silelihasrakkude jagunemist. Silelihasrakkude jagunemine osaleb ateroskleroosi tekkes, seega võivad NO antimitogeensed omadused mängida kaitsvat rolli.

Sarnaselt vasorelaksatsioonile mõjub NO trombotsüütide agregatsioonile cGMP ja rakusisesel kaltsiumi väljavoolu kaudu. Tulemuseks toimub glükoproteiini IIb/IIIa aktiivkompleksi inhibeerimine ning nõrgenevad trombotsüütide sidemed fibrinogeeniga [43]. Uuringud näitavad, et eNOS-i inhibeerimine lühendab veritsusaega, samas kui NO kõrge tase takistab trombotsüütide agregatsiooni *in vivo* [44].

NO mõju vererakkudele ei piirdu üksnes trombotsüütidega, vaid laieneb ka leukotsüütidele, mille adhesioon vaskulaarsele endoteelile nõrgeneb NO kõrgemate kontsentratsioonide puhul [45]. NOS-i inhibeerimise ootuspäraseks tagajärjeks on leukotsüütide adhesiooni suurenemine. Võimalikuks mehhanismiks pakutakse NO võimet stabiliseerida I κ B α , mis inhibeerib tuumafaktor κ B (NF- κ B).

Kesknärvisüsteemis on nNOS laialdaselt ekspresseeritud. NO puhul on näidatud kooslokaliseerumist paljude teiste neurotransmitteritega (nt serotoniin, GABA jt) [46]. On tõestatud, et nNOS produtseerib peaaegu kogu kesknärvisüsteemis leiduva NO [47]. nNOS-i kõrge aktiivsus esineb väikeajus, keskajus, hüpotaalamuses, ajukoores ja hipokampuses [48]. NO arvatakse olevat kaasatud mitmetesse füsioloogilistesse ja patofüsioloogilistesse protsessidesse ajus – on leitud tõestusi NO rolli kohta valu moduleerimisel [49], toitumise reguleerimisel [50], õppimisel ja mälu protsessides [51], ärevusprotsessides [52], depressiooni mehhanismides [53] jne.

Rakulisel ja molekulaarsel tasemel moduleerib NO erinevate klassikaliste neurotransmitterite toimet – on uuritud NO mõju serotoniini, dopamiini, GABA ja glutamaadi vabastamisele sünapseis [54,55]. Mõned uurijad on pakkunud välja ka nn NO-vahendatud vanenemishüpoteesi [56]. NO neurotoksilised omadused ilmnevad vaid selle kõrge kontsentratsiooni juures ning on tihedalt seotud NO-vahendatud apoptoosi indutseerimisega, viies närvirakkude degeneratsioonile.

2.1.5. NO roll immuunsüsteemis

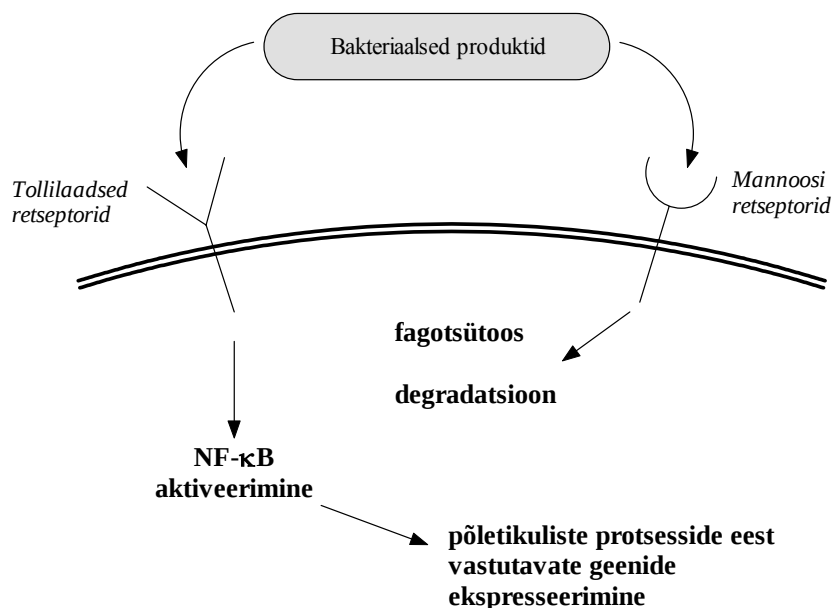
NO toimed immuunsüsteemis on seotud indutseeritava NOS-iga. Esmalt makrofaagides avastatud iNOS-i seostati kõigepealt tsütotoksiliste mehhanismidega, mis aktiveeruvad vastusena bakteriaalsetele endotoksiinidele või proinflammatoorsetele tsütokiinidele. Lisaks makrofaagidele sünteesivad NO-d ka NK-rakud ja neutrofiilid [57,58,59].

Pärast induktsiooni immuunrakus sünteesib iNOS suures koguses NO-d, tagades koos teiste kaasasündinud immuunsuse mehhanismidega kiire vastuse ja kaitse mitmesuguste ainuraksete, bakterite, seente ja viiruste vastu [60]. Samuti on NO oluline erinevate tsütokiinide sünteesi reguleerimisel ning Th1 rakkude jagunemisel [61].

iNOS on oluline osaleja põletikuprotsessides, mida käsitletakse organismi kaitsevastusena erinevatele ähvardavatele agentidele eesmärgiga kõrvaldada kahjustust või selle põhjust (mikroorganismid, trauma jne). Ägeda põletiku kestus ulatub tavaliselt minutist ööpäevani ning neurofiilid koos makrofaagidega on selles faasis domineerivad rakutüübid. Krooniline põletik võib kesta nädalaid ja isegi kuid ning seda iseloomustavad lümfotsüütide ja makrofaagide ülekaal, koekahjustused ning nekroos. Põletik on tihedalt seotud parandamisprotsessidega (nt angiogenees).

Proinflammatoorsed reaktsioonid lülitatakse rakus sisse vastusena välisele signaalile, milleks on tihti mikroorganismi spetsiifilised molekulid (joonis 5). Hiljuti avastatud tollilaadsete retseptorite perekond (TLR, *toll-like receptors*) osaleb imetajate kaasasündinud immuunsuse aktiveerimisel, kusjuures TLR4 ligandideks on lipopolüsahhariid (LPS) ja lipoteiinhape (LTA) [62]. Nende retseptorite kaudu aktiveerub NF- κ B, mis indutseerib erinevate proinflammatoorsete tsütokiinide, eikosanoidide ja NO sünteesi. Huvitav on ka see, et NO-l on põletikuprotsessis duaalsed omadused. Sõltuvalt põletiku faasist võib NO olla pro- või antiinflammatoorne agent. Põletiku varajases staadiumis eNOSi poolt väikestes kogustes sünteesitava NO-l on pigem põletikuvastased omadused, mis inhibeerivad leukotsüütide migratsiooni põletikukoldesse ja takistavad adhesioonivalkude sünteesi [63]. Põletiku hilisemas staadiumis sünteesib iNOS NO-d suurtes kogustes. Tagajärjena reageerib NO hapniku superoksiidiga ning moodustub äärmiselt tsütotoksiline peroksünitrit – molekul, mis arvatakse osalevat paljude põletikuliste haiguste (nt dermatiit, astma, reumatoidne artriit jt) puhul [64]. iNOSi kõrge ekspressioon on tuvastatav näiteks allotransplantatsioonijärgses äratõukereaktsioonis. NO-d seostatakse transplantaadi ateroskleroosi tekkega ja tsütotoksiliste protsessidega siirdatud koes [65].

Lisaks põletikulise protsessi regulatsioonile osaleb NO ka otseses interaktsioonis invasiivsete mikroorganismidega, mida hävitatakse samuti perooksünitriti abil. iNOS-i ekspressioon ja kõrgendatud NO produktsioon on hästi uuritud närilistel, nii *knockout* mudelil kui ka makrofaagidel [60]. Inimestel on iNOS-i ja NO täpne roll mikroobivastases võitluses siiani ebaselge. iNOS-i ekspressiooni ja NO sünteesi kohta on leitud tõendeid malaaria, tuberkuloosi ja urotrakti infektsioonide puhul [66,67].



Joonis 5. Lihtsustatud skeem rakusiseste signaalsüsteemide aktiveerimisest

Peale toimimise efektormolekulina, arvatakse NO omavat olulist regulatiivset rolli immuunsüsteemis. NO reguleerib näiteks T-helper-rakke, NK-rakke ning nuumrakke [68]. Hiljutised uuringud näitavad, et NO toimib tugeva immuunmodulaatorina tsütokiinide sünteesile, avaldades mõju Th1 ja Th2 tsütokiinide tasakaalule [32]. Hiire mudelis inhibeerib iNOS-i poolt kõrgetes kontsentratsioonides sünteesitud NO Th1 rakkude jagunemist ja IFN γ produktsiooni [69], kuid soodustab tsütokiinide tootmist Th2 rakkude poolt [70]. Sellise reaktsiooni tagajärjeks on pakutud IgE-tüüpi antikehade suurenenud sünteesi ja selle tulemusena IgE-vahendatud haiguste (nt astma) arenemist [71]. Sõltuvalt kontsentratsioonist reguleerib NO immuunrakkude eluiga, indutseerides või inhibeerides neis apoptoosi või suunates neid nekroosi. Negatiivse tagasiside kaudu mõjub NO Th1 rakkudele, kaitstes organismi erinevate autoimmuunsete protsesside eest [72] ja moduleerides nt naha hüpersensitiivsust [73].

Kokkuvõttes võib järeldada, et NO on immuunsüsteemis kaasatud väga mitmetasandilisse regulatoorsesse võrgustikku ega piirdu üksnes mõjuga ühele rakutüübile. Tabel 3 võtab kokku NO funktsioonid immuunsüsteemis.

Tabel 3. NO vahendatud toimed immuunsüsteemile koos võimalike mehhanismidega [60]

Toime	Rakud	Mehhanism
Antimikroobne	makrofaagid, mikroglia, neutrofiilid, eosinofiilid, fibroblastid, endoteeli- ja epiteelirakud, astroglia	* otsene mõju patogeenile * kaudne efekt (peroksünitriti, arginiini ammendamise jne kaudu)
Kasvajavastane	makrofaagid, eosinofiilid	* kasvaja jaoks oluliste ensüümide inhibeerimine * arginiini ammendamine * rakutsükli pidurdamine tsükliini D1 inhibeerimise kaudu * apoptoosi induktsioon kaspaaside aktivatsiooni ja p53 akumulatsiooniga
Koekahjustus	makrofaagid, mikroglia, astroglia, keratinotsüüdid	* parenhüümirakkude nekroos * rakuvälise maatriksi degradatsioon * mesenhüümirakkude jagunemise pidurdamine * põletikurakkude juurdevool tänu kemokiinide regulatsioonile
Põletikuvastane	makrofaagid	* T rakkude ja antigeeni esitlevate rakkude apoptoos * MHC II molekulide ja tsütokiinide sünteesi blokeerimine * DNA sünteesi inhibeerimine * signaalkaskaadide lõhkumine * adhesioonivalkude sünteesi pidurdamine

Toime	Rakud	Mehhanism
Tsütokiinide, kemokiinide ja kasvufaktorite regulatsioon	makrofaagid, T-rakud, fibroblastid, endoteelirakud	* signaalkaskaadide moduleerimine (G-valgud, kaspaasid, proteiin-fosfotaasid) * transkriptsioonifaktorite sünteesi reguleerimine (NF- κ B, Sp1, AP-1) * IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, IFN- γ , TNF, TGF- β , G-CSF, M-CSF, VEGF, MIP-1 α , MIP-2, MCP-1.
T-helperrakkude diferentseerumine	nt makrofaagid	* Th1 rakkude indutseerimine * IL-12 sünteesi moduleerimine

2.2. Immuunmoduleerivad ravimid ja NO süntees

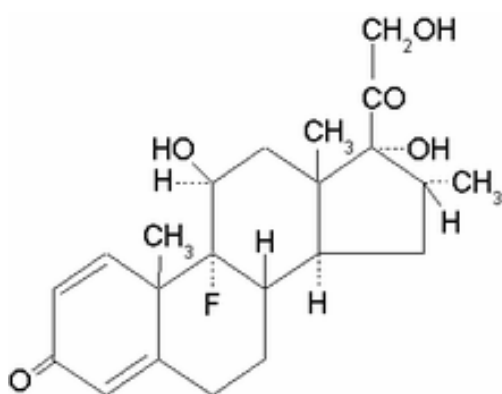
Arvestades NO mitmeid rolle organismis peetakse NO sünteesi mõjustamist ka lubavaks ravimiarenduse strateegiaks. Tööd käivad nii NOS-ide ja L-arginiini metabolismi teiste ensüümide inhibiitorite kui ka nende aktivaatorite testimisel. Mitmed uuringud keskenduvad NO- süsteemi moduleerivatele ainetele, et leida ravimeid mitmesugustele kroonilise põletikuga kulgevatele haigustele (nt. astma, reumatoidartriit etc). NOS-i inhibiitoreid saab jagada gruppidesse vastavalt toime mehhanismile. Eristatakse substraadi (L-arginiini) analooge, NOS-i dimerisatsiooni inhibiitoreid (nt klotrimidasool), ensüümi kofaktorite blokeerijaid (nt antipteriin), transkriptsiooni tasemel tegutsevaid inhibiitoreid (nt glükokortikoidid) jne [74,75].

Mitmetel juba kliinilises praktikas kasutuses olevail immuunmodulaatoreil on kirjeldatud mõju ka NO sünteesile.

2.2.1. Glükokortikoidid

Üheks oluliseks ravimite rühmaks, mis võeti kasutusele eelmise sajandi viiekümnendatel aastatel, on glükokortikoidid – nende sünteetiliste derivaatide abil ravitakse siiani erinevaid kroonilisi ja akuutseid põletikke. Glükokortikoidid seostuvad rakumembraanil oleva glükokortikoidi retseptoritega, mille osa pärast signaali translotseerub rakutuuma, kus aktiveerib transkriptsiooni teatud geenidelt [76]. On tõestatud, et selliste geenide hulgas on põletikuvastaseid molekule kodeerivad geenid (nt IL-1 retseptori antagonist, NF- κ B inhiveeriv I κ B α jt). Lisaks sellele represseerivad glükokortikoidid proinflammatoorsete geenide transkriptsiooni, eelkõige COX-2 ja iNOS-i geeni [77].

NO kontekstis on üheks enamuuritud glükokortikoidiks deksametasoon (joonis 6), mida hakati lähemalt uurima pärast 1990. aastal avastatud supresseerivat toimet iNOS-ile ja NO sünteesile LPS/INF- γ indutseeritud makrofaagides ja endoteelirakkudes [78].



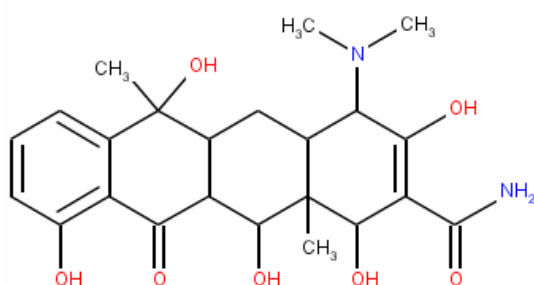
Joonis 6. Deksametasooni keemiline valem

Hiljem avastati deksametasooni inhiveerivat mõju NO produktsioonile ka teistes rakkudes *in vitro* ja *in vivo* [79,80].

Vähem on teada deksametasooni toimest L-arginiini transpordile.

2.2.2. Tetratsükliin

Tetratsükliin (joonis 7) on eeskätt tuntud küll antibiootikumina, kuid lisaks on molekulil leitud mitmeid toimeid põletikule, proteolüüsile, angiogeneesile, apoptoosile ja luu metabolismile [81,82,83]. Nii kasutatakse tetratsükliini nt teatud immuunvahendatud nahahaiguste ravis.

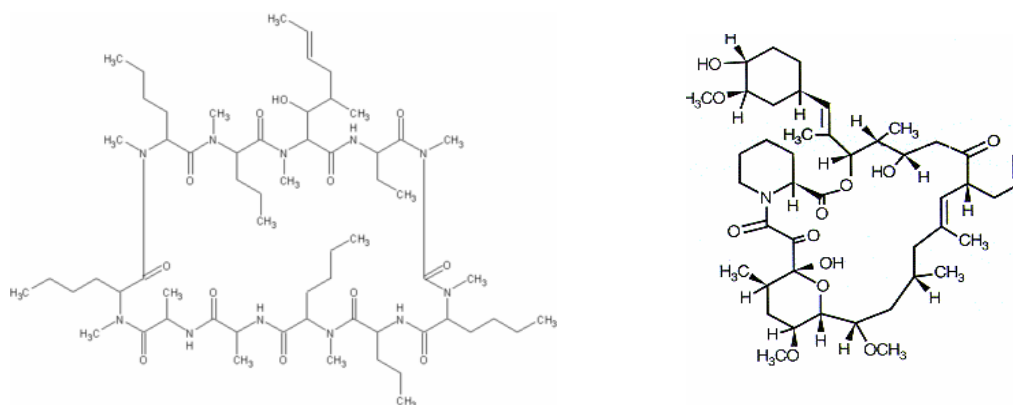


Joonis 7. Tetratsükliini keemiline valem.

Mõned uuringud on näidanud tetratsükliini toimet ka NO sünteesile. Tetratsükliini derivaadid pidurdavad NO sünteesi aktiveeritud RAW 264.7 makrofaagides suurendades ilmselt iNOS-i mRNA degradatsiooni [84]. Tetratsükliini põletikuvastased omadused leidsid kinnitust ka J774 makrofaagides, kus samuti täheldati NO ja IL-12 sünteesi vähenemist ning apoptoosi indutseerimise mahasurumist [85]. Lisaks iNOS-i pärssivale toimele avastati tetratsükliini supresseeriv mõju IL-1 α ja TNF- α produktsioonile *in vivo*, mis koos kaitsesid katseloomi endotokseemia eest [86]. Arvatakse, et tetratsükliini põletikuvastased omadused põhinevad eelkõige toimel iNOS-ile ja erinevate tsütokiinide blokeerimisel [87]. Teaduskirjanduses puuduvad viited tetratsükliini otsesele toimele arginaasidele või L-arginiini transpordile.

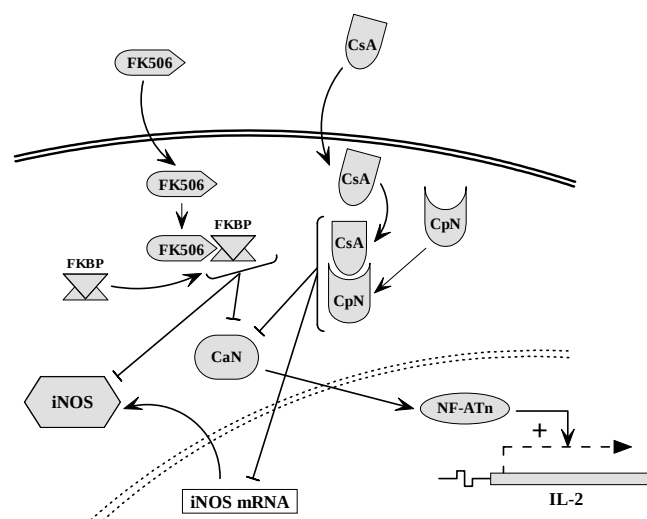
2.2.3. Kaltsineuriini inhibiitorid

Suhteliselt palju on uuritud kaltsineuriini inhibiitorite tsüklosporiin A (edaspidi tsüklosporiin; joonis 8) ja takroliimuse (FK506) toimeid NO sünteesile.



Joonis 8. Vasemal tsüklosporiin A keemiline struktuur; tegemist on seenest *Tolypocladium inflatum* eraldatud oligopeptiidiga. Paremal takroliimuse (FK506) keemiline struktuur; tegemist on bakterist *Streptomyces tsukubaensis* eraldatud makroliidse antibiootikumiga.

Mõlemat ravimit kasutatakse immuunsuppressandina koosiirdamisel, sealjuures tsüklosporiini juba üle 30 aasta. Kaltsineuriini inhibiitorite toimemehhanism on toodud joonisel 9.



Joonis 9. Tsüklosporiini ja takroliimuse toimemehhanismid. CsA – tsüklosporiin; CpN – tsüklofüliin; FK506 – takroliimus; FKBP – takroliimusega seostuv proteiin; CaN – kaltsineuriin; NF-ATn – aktiveeritud T-rakkude tuumafaktor

On leitud, et tsüklosporiin inhibeerib T-rakkude aktivatsiooni [88], IL-2 ja TNF produktsiooni [89].

Tsüklosporiini kui tugeva kaltsineuriini inhibiitori võimalikuks toimet mehhanismiks on pakutud NF- κ B mahasurumist, mille tulemusena inhibeeritakse koefaktori (TF) ekspressiooni. Selle hüpoteesi tõestused on leitud makrofaagides [90]. Mitmed uuringud on näidanud tsüklosporiini inhibeerivat toimet iNOS-i aktiivsusele erinevates rakkudes *in vitro* ja *in vivo* – RAW 264.7 makrofaagides [91], J774 makrofaagides ja T84 soole epiteelirakkudes. Märkimisväärne on asjaolu, et iNOS-i inhibeerimine võib toimuda ka NF- κ B-st mittesõltuval viisil [92]. Mõned andmed lubavad järeldada, et tsüklosporiin ja takroliimus avaldavad otsest mõju iNOS-ile, blokeerides selle mRNA sünteesi [93].

Kuigi takroliimuse ja tsüklosporiini toimet mehhanismid on sarnased (joonis 9), arvatakse, et NO sünteesi puhul on tegemist siiski erinevate blokeerimisviisidega, viidates takroliimuse võrdlemisi nõrgale, ilmselt posttranskriptsioonilisele toimele iNOS-i mahasurumisel [94]. Mõned uurijad on arvamisel, et takroliimuse toime on vahendatud valgu STAT6 kaudu [95]. NO sünteesi mahasurumise tagajärjena on täheldatav tsüklosporiini pidurdav mõju LPS ja INF- γ indutseeritud makrofaagide apoptoosile, kusjuures võrdsetes kontsentratsioonides on tsüklosporiini toime tugevam kui takroliimusel [96].

Kirjanduses pole andmeid selle kohta, kas tsüklosporiinil ja takroliimusel võiks esineda mõju arginiini transpordile. Arvatakse, et mõlemal raviainel võib esineda kaudne toime, mis põhineb kõigepealt kaltsineuriini ja iNOS-i blokeerival omadusel [97].

3. TÖÖ EESMÄRGID

Töö eesmärgiks oli uurida erinevate immuunmoduleerivate ravimite mõju L-arginiini/NO süsteemile LPS-indutseeritud RAW 264.7 makrofaagides.

Töö alaeesmärkideks olid:

- kirjeldada tetratsükliini, takroliimuse, tsüklosporiini ning deksametasooni toimet LPS-indutseeritud NO sünteesile;
- kirjeldada samades tingimustes nende ravimite toimet L-arginiini transpordile.

4. MATERJALID ja METOODIKA

4.1. Rakukultuur ja kemikaalid

Kõik töös kasutatud kemikaalid olid soetatud Sigma-Aldrich'i korporatsioonist kui ei ole märgitud teisiti.

Hiire makrofaagide liin RAW 264.7 soetati Ameerika Tüüpkultuuride Kolleksioonist (ATCC) (*LGC Promochem*, Rootsi). Tegemist on kasvaja rakuliiniga, mida kasutatakse sageli iNOS-i uuringuis.

Rakke kultiveeriti DME söötmes, mis sisaldas 10% veise looteserumit ja 1% penitsiliini-streptomütsiini segu, 37°C juures 5% süsihappegaasi atmosfääris.

Eksperimentides külvati makrofaagid tihedusega $0,2 \times 10^6$ 24-auguga koekultuuri plaatidele ning lasti kinnituda ja kohaneda 24 tundi eeldades rakkude ühtlast kasvu. Seejärel lisati rakkudele *Salmonella typhimurium*'i LPS-i (*Alexis Biochemicals*, Šveits) lõppkontsentratsioonis 1 µg/ml.

Samaagselt LPS-ga lisati plaatidele testitavad ained igas tabelis 4 toodud kontsentratsioonis kuues paralleelis ja inkubeeriti 24 tunni jooksul.

Positiivse ja negatiivse kontrolli tagamiseks kasvatati rakke ilma testitavate aineteta vastavalt LPS-i juuresolekul või ilma selleta.

Töös on toodud ühekordsete katsete tulemused.

Tabel 4. Töös kasutatud immuunmoduleerivate ainete lõppkontsentratsioonid

Takroliimus (FK506)	Tsüklosporiin	Tetratsükliin (hüdrokloriid)	Deksametasoon (naatriumfosfaat)
0,1 µM	0,1 nM	50 µM	0,001 µM
1 µM	1 nM	150 µM	0,01 µM
10 µM	10 nM	300 µM	0,1 µM
	100 nM		1 µM

4.2. Töös rakendatud meetodid

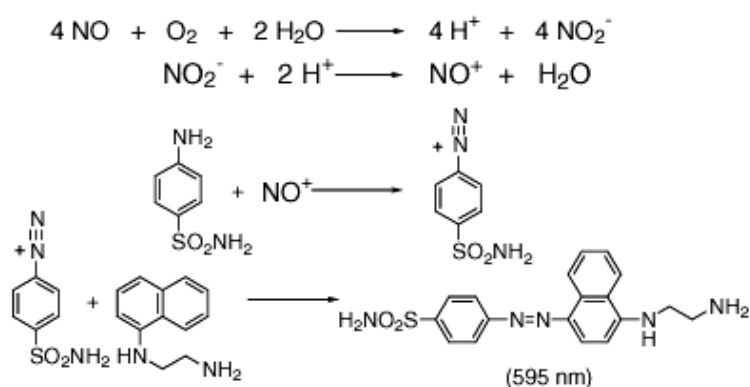
4.2.1. Rakkude eluvõimelisuse määramine

Makrofaagide eluvõimelisus määrati kolorimeetriliselt *CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega) abil pärast 24-tunnist inkubatsiooni LPS-i ja uuritavate ravimitega.

Kommertsiaalse kiti töö põhineb kahel ainel – tetrasooliumi ühendil (MTS) ja elektrone siduval fenasiinmetosulfaadil (PMS). Metaboolset aktiivsetes rakkudes muudetakse MTS dekarboksülaaside poolt vesilahustuvaks famozaaniks, mille adsorptsiooni mõõdetakse spektrofotomeetriga 490 nm lainepikkusel (Sunrise Remote/ Touch screen Tecan TW/TC).

4.2.2. NO sünteesi mõõtmine

Lämmastikmonooksiidi reaktiivsuse ja lühikese eluea tõttu on keeruline mõõta otseselt selle hulka. NO oksüdeerub kiiresti nitritiks ja nitraadiks. Seepärast kasutatakse sageli kaudset meetodit, nn Griessi reaktsiooni (joonis 10), millega on võimalik mõõta kolorimeetriliselt nitritite hulka vesilahuses [98].



Joonis 10. Griessi reaktsiooni üldvalem

Kasutatud meetodi tundlikkus algab 1 μM NO_2^- sisaldusest. Tekkinud nitraatide taseme arvestamiseks redutseeritakse need kaadmiumi abil nitrititeks.

24 tunni jooksul LPS-i ja testitavate ainetega mõjutatud rakkudel kogutud söötmed deproteiniseeriti inkubeerides neid 15 minuti jooksul segatuna 25 µl 30% ZnSO₄ lahusega. Seejärel tsentrifuugiti uuritav materjal 4000 p/min 5 min ja supernatant eraldati sademest.

Igasse analüüsitubi kaaluti 0,5 g Cd graanuleid, mida pesti kaks korda enne kasutamist 0,1 M soolhappega, veega ning 0,1 M ammooniumhüdroksiidiga. Seejärel lisati igasse tuubi 200µl deproteiniseeritud analüüsivat lahust, asetati loksutile ning inkubeeriti suletud tuubides üleöö.

Seejärel kanti uuritavad lahused puhtasse analüüsitubi ja tsentrifuugiti 5 minutit 4000 p/min. Mikroplaadi igasse auku pipeteeriti 100 µl uuritavat lahust ja 100 µl Griessi reagenti (sulfaniilamid koos N-naftüül-etüleendiamiiniga) kahes paralleelis. Nitritite standardkõver saadi erineva kontsentratsiooniga NaNO₂ lahuste kasutamisel. Tekkinud värvusreaktsiooni intensiivsus mõõdeti lainepikkusel 540 nm spektrofotomeetri abil (Sunrise Remote/ Touch screen Tecan TW/TC). Tulemustest lahutati puhta rakusöötme nitritite ja nitraatide tase, et hinnata üksnes juurdetekkinud nitraatide ja nitritite hulka.

4.2.3. L-arginiini transpordi mõõtmine

Arginiini transpordi mõõtmiseks kultiveeriti makrofaage 24 tundi koos LPS-i ja testitavate ainetega. Seejärel asendati sööde 100 µl 100 nM [³H]-L-arginiini sisaldava Hanks'i lahusega ja inkubeeriti 15 minutit. Järgmise sammuna eemaldati sööde ning mikroplaadi põhjale kinnitunud makrofaagid pesti kaks korda sooja fosfaatpuhvri lahusega ja võeti üles 100 µl destilleeritud vees. Rakud lüüsi kolmekordse külmutamise/sulatamise tsükliga. Rakususpensioonile lisati stsintillatsioonikokteili (Quicksafe A, Zinnser Analytic, Saksamaa) ning radioaktiivsus mõõdeti beetaloenduri abil. Valk määrati vastavalt Lowry meetodile ja L-arginiini transport normaliseeriti valgu hulga suhtes nagu originaalmeetod ette näeb [99].

4.2.4. Üldvalgu hulga määramine

L-arginiini transpordi mõõtmise katsete rakususpensioonis määrati üldvalgu hulk Lowry meetodil [100]. Standardkõvera modelleerimiseks kasutati veise seerumi albumiini.

4.2.5. Andmete statistiline töötlus

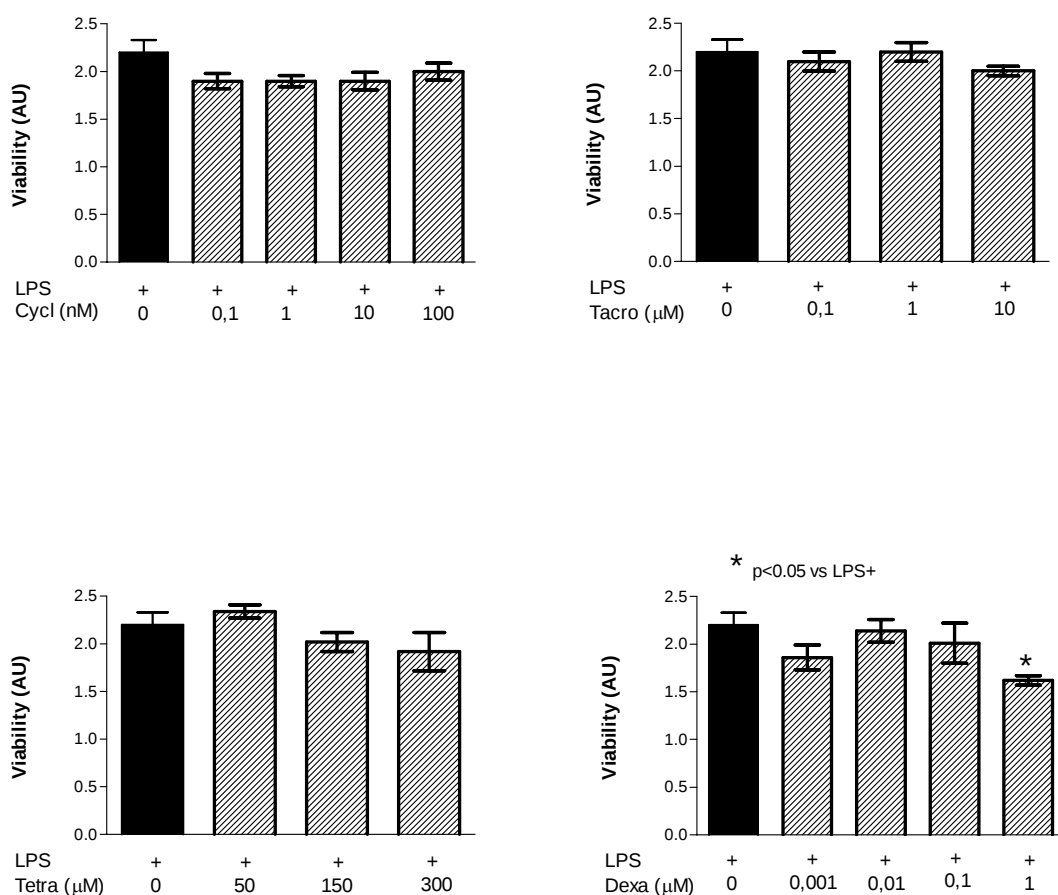
Andmed on esitatud gruppide keskmiste väärtustena $\pm$ SEM. Gruppide statistiliseks võrdlemiseks kasutati standardhälvete parameetrilise jaotuse korral ANOVA-t ja Newman-Keuls'i testi ning mitteparameetrilise jaotuse korral Mann-Whitney U testi. Statistiliselt oluliseks peeti p väärtusi $<0,05$.

5. TULEMUSED

Töös on toodud ühekordsete katsete tulemused. Kõik inkubatsioonid on teostatud 6 paralleelis.

5.1. Uuritavate ainete toime makrofaagide eluvõimelisusele

Kasutatud neli ravimit ei mõjutanud oluliselt LPS-ga stimuleeritud makrofaagide eluvõimelisust tabelis 4 toodud kontsentratsioonides, välja arvatud kõrgeimas doosis deksametasoon. 1 μM deksametasoon pärssis mõnevõrra rakkude metaboolset aktiivsust (Newman-Keuls'i test, $p < 0,05$; joonis 11). Ilma LPS stimulatsioonita oli makrofaagide eluvõimelisus $2,4 \pm 0,1$ AU.



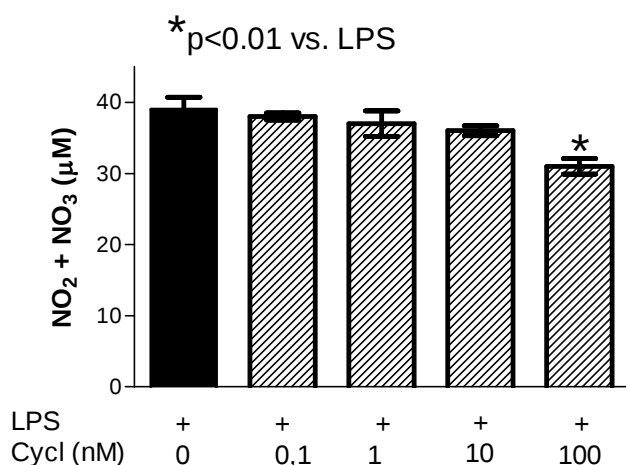
Joonis 11. Tsüklosporiini, takroliimuse, tetratsükliini ja deksametasooni toime rakkude eluvõimelisusele.

5.2. Immuunmodulaatorite toime LPS-indutseeritud NO sünteesile

LPS-stimuleerimata makrofaagides ei olnud NO tootmine detekteeritav.

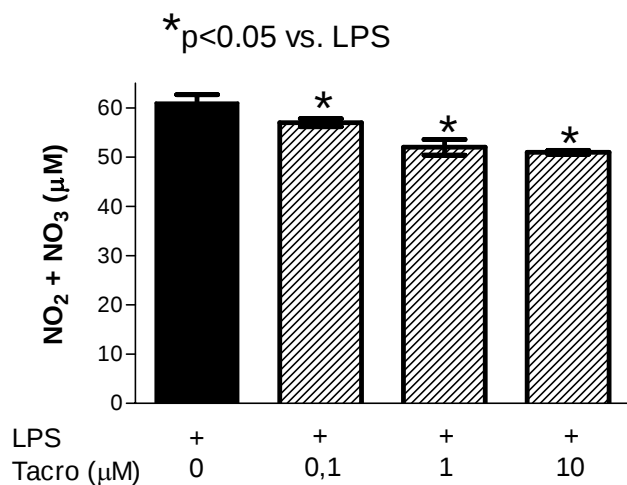
Kõigil uuritud immuunmodulaatoritel ilmnes LPS-i poolt indutseeritud NO tootmist pidurdav efekt ühes või mitmes kasutatud kontsentratsioonis. Tulpdiagrammidel on toodud söötme nitritite (NO_2) ja nitraatide (NO_3) summaarne kontsentratsioon rakukultuuriplaadi aukudes (μM).

Tsüklosporiin pärssis nitritite ja nitraatide teket kõige kõrgemas kasutatud doosis – 100 nM (Newman-Keuls'i test, $p < 0,01$; joonis 12).



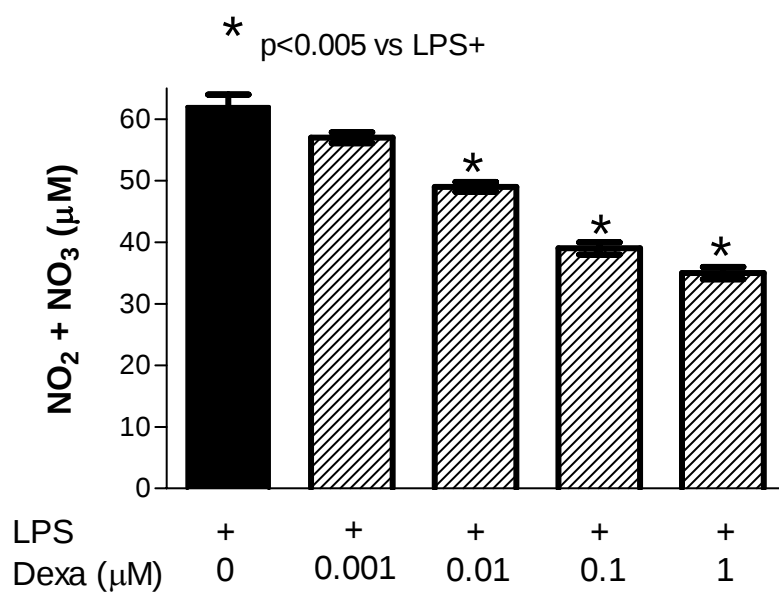
Joonis 12. Tsüklosporiini mõju NO sünteesile LPS-aktiveeritud makrofaagides.

Takroliimusel oli oluline NO tootmist pärssiv toime kõigis kolmes uuritud kontsentratsioonis (Newman-Keuls'i test, $p < 0,05$; joonis 13).



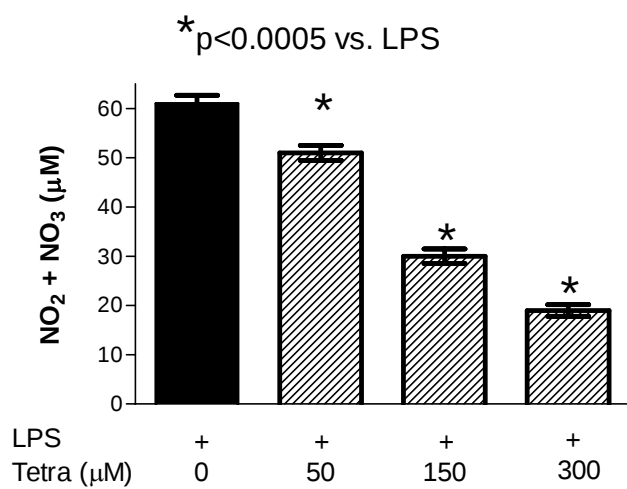
Joonis 13. Takroliimuse (FK506) mõju NO sünteesile LPS-aktiveeritud makrofaagides.

Ka deksametasoonil ilmnes doosist sõltuv NO sünteesi vähendav toime (Mann-Whitney *U* test, $p<0,005$; joonis 14).



Joonis 14. Deksametasooni mõju NO sünteesile LPS-aktiveeritud makrofaagides.

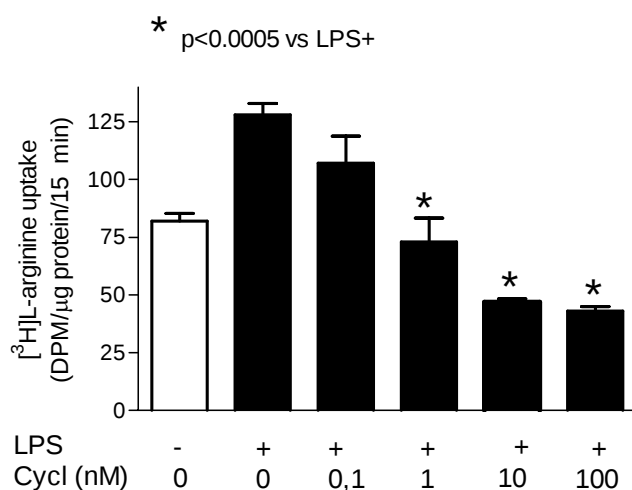
Tetratsükliinil ilmnes selge doosist sõltuv NO tootmist pidurdav toime (Newman-Keuls'i test, $p<0,0005$; joonis 15).



Joonis 15. Tetratsükliini mõju NO sünteesile LPS-aktiveeritud makrofaagides.

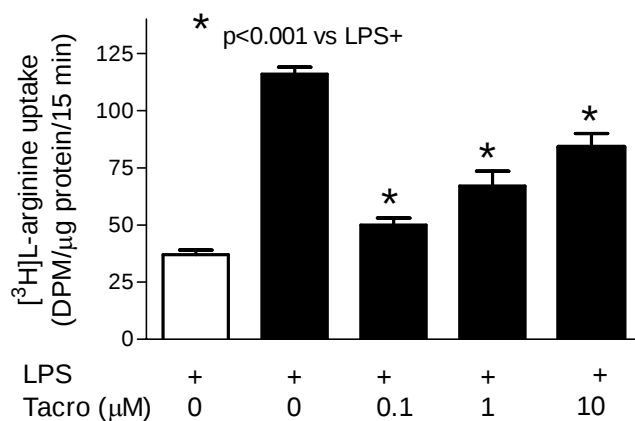
5.3. Uuritavate ainete toime L-arginiini transpordile rakkudesse

Tsüklosporiin põhjustas L-arginiini indutseeritud transpordi märkimisväärse pidurdumise kolmes kõrgemas kontsentratsioonis (Newman-Keuls'i test, $p < 0,0005$; joonis 16).



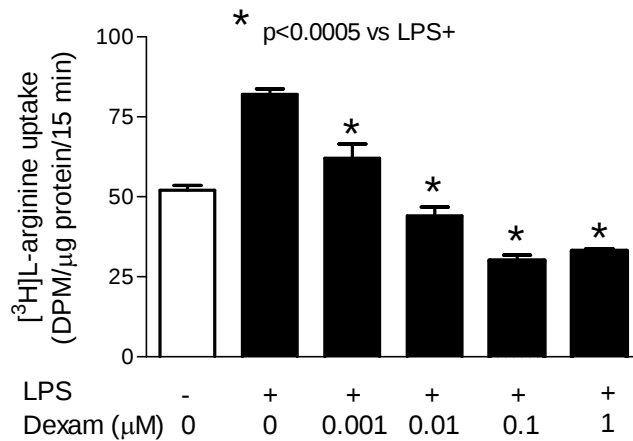
Joonis 16. Tsüklosporiini doosist sõltuv efekt L-arginiini transpordile LPS-aktiveeritud makrofaagides.

Takroliimuse puhul ilmnes paradoksaalne doosist sõltuv pärssiv toime L-arginiini stimuleeritud transpordile (Newman-Keuls'i test, $p < 0,001$; joonis 17).



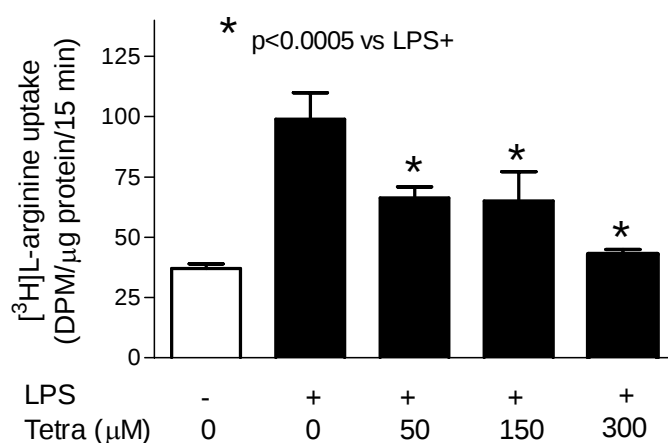
Joonis 17. Takroliimuse toime L-arginiini transpordile LPS-aktiveeritud makrofaagides.

Ka deksametasoon avaldas doosist sõltuvat pärssivat toimet L-arginiini transpordile (Newman-Keuls'i test, $p < 0,0005$; joonis 18).



Joonis 18. Deksametasooni toime L-arginiini transpordile LPS-aktiveeritud makrofaagides.

Tetratsükliin pidurdas L-arginiini transporti kõigis kolmes kontsentratsioonis võrdselt (Newman-Keuls'i test, $p < 0,0005$; joonis 19).



Joonis 19. Tetratsükliini efekt L-arginiini transpordile LPS-aktiveeritud makrofaagides.

6. ARUTELU

6.1. Immuunmodulaatorite toime rakkude eluvõimelisusele

Kasutatud kontsentratsioonides ei kahjustanud uuritud immuunmodulaatorid LPS-stimuleeritud RAW 264.7 makrofaagide eluvõimelisust. Ainsaks erandiks oli deksametasooni kõrgeim kontsentratsioon (1 μM). Ka varasemates töödes on vastavate ravimite toksilised toimed ilmnenu kõrgetes kontsentratsioonides. Nii on tetratsükliinil leitud toksiline toime J774 makrofaagidele alates 500 μM kontsentratsioonist [87]. Tsüklosporiini toksilise toime kohta makrofaagidele ei ole otseseid andmeid, kuid on teada, et kuni 10 μM kontsentratsioonides ei pidurda see J774 eluvõimelisust [94,96,92].

Takroliimuse puhul ei kirjeldatud J774 makrofaagide ja T84 soole epiteelirakkude eluvõimelisuse langust kuni 30 μM kontsentratsioonini [92]. Deksametasoonil on varem leitud toksiline toime J774 makrofaagidele alates kontsentratsioonist 2,5 μM [101], mis on lähedane käesoleva uurimistöö katsetes toksiliselt mõjunud kontsentratsioonile (1 μM).

6.2. Immuunmodulaatorite toime LPS-indutseeritud NO sünteesile ja L-arginiini transpordile

Kõik uuritud immuunmodulaatorid pidurdasid NO sünteesi LPS-stimuleeritud makrofaagides. Kui tsüklosporiin ja takroliimus põhjustasid uuritud kontsentratsioonides vaid väikese languse NO sünteesis, siis tetratsükliin ja deksametasoon olid tugevad LPS-stimuleeritud NO sünteesi pärssijad. Kuigi käesolevas uurimistöös toodud tulemused on üldiselt kooskõlas varemavaldatud andmetega, peab siiski suhtuma ettevaatlikult NOS inhibiitorite *in vitro* katsete tulemuste ülekantavusse *in vivo* olukorda, milles NO kaitsvad ja toksilised toimed võivad esineda paralleelselt [102].

6.2.1. Kaltsineuriini inhibiitorite efektid

Varasemad uuringud on näidanud tsüklosporiini kõrgemate kontsentratsioonide (1-30 μM) pärssivat toimet NO sünteesile LPS-aktiveeritud J774 ja RAW 264.7 makrofaagides ning T84 soole epiteelrakkudes [91,94,92]. LPS- stimuleeritud RAW 264.7 makrofaage kasutades on leitud, et väikseim NO sünteesi pidurdav tsüklosporiini kontsentratsioon on 5 $\mu\text{g/ml}$ (4,1 μM) [91]. Tsüklosporiini NO sünteesi inhibeeriv toime J774 makrofaagidele tekkis 1 μM kontsentratsioonist [92]. Käesoleva uurimistöö katsetes tekkis NO sünteesi pidurdumine oluliselt madalamas kontsentratsioonis (100 nM). Oluline on märkida, et Hämalainen jt. [92] töös oligi 1 μM kontsentratsioon uurituist madalaim, nii et on täiesti võimalik, et NO sünteesi inhibeeriv toime avaldunuks ka madalamates kontsentratsioonides. RAW 264.7 makrofaage kasutanud töös uuriti ka tsüklosporiini 0,8 μM kontsentratsiooni, mis oli toimetu [91]. Tsüklosporiini minimaalselt toimiv kontsentratsioon käesolevas uuringus on lähedane selle ravimi terapeutilisele kontsentratsioonile. Arvestades, et tsüklosporiini terapeutiliseks kontsentratsiooniks veres loetakse vahemikku 100-400 ng/ml (80-320 nM), võib NO sünteesi pidurdamine olla osaks tsüklosporiini kliinilistest toimetest ja/või kõrvaltoimetest. Tsüklosporiini võimalikuks toimemehhanismiks NO sünteesi vähendamisel pakutakse selle otsest inhibeerivat toimet NO sünteesile [93] või iNOS-i ekspressioonile [91,92]. Viimane näib tõenäolisem, kuna tsüklosporiini efekt on tugevaim, kui seda lisada rakkudele vahemikus 1 tund enne inkubatsiooni algust LPS-ga kuni 4 tundi pärast stimulatsiooni algust, ning väheneb märgatavalt hilisemal lisamisel.

Huvitavaks leiuks on tsüklosporiini pärssiv toime L-arginiini transpordile juba märkimisväärselt madalamates kontsentratsioonides (alates 1 nM) kui ilmneb NO sünteesi pidurdumine (joonis 16). Kuna L-arginiini transport suureneb paralleelselt NO sünteesi aktiivsusega [103], siis on ilmselt võimalik ka vastupidine mõju, st kui ravim pidurdab NO sünteesi aktiivsust, langeb vastavalt ka L-arginiini transport. Tsüklosporiini toimet NO sünteesile ja L-arginiini transpordile võrreldes on siiski tõenäolisem, et antud ravim omab otsest toimet L-arginiini transpordile. Kirjanduses ei ole seni kirjeldatud tsüklosporiini efekti L-arginiini transpordile. Maksimaalne L-arginiini transpordi pidurdumine tekkis tsüklosporiini kontsentratsiooni juures, mis NO sünteesi pidurdumist ei põhjustanud. Seega võib arvata, et L-arginiini transpordi pidurdamine ei ole peamine mehhanism, mille kaudu tsüklosporiin langetab NO sünteesi. Küll võib L-arginiini transpordi pidurdamine osaleda tsüklosporiini NO sünteesi pidurdavas toimes. Kas toime L-arginiini transpordile võiks

omada kliinilist tähendust või põhjustada teiste L-arginiinist lähtuvate radade aktiivsuse muutust ei ole hetkel selge ja vajaks lisauuringuid.

Takroliimuse toime NO sünteesile oli täheldatav kõikides töös kasutatud kontsentratsioonides (0,1-10 μ M, joonis 13). Ainus varasem uuring, milles on kasutatud RAW 264.7 makrofaage, ei leidnud takroliimusel NO sünteesi mõjustavat toimet [91]. Ilmselt oli selle põhjuseks märgatavalt väiksema ravimikontsentratsiooni kasutamine (5 nM vs. 100 nM käesolevas uuringus). Muus osas olid uuringute disainid küllaltki sarnased, nitraadi teket mõõtis eelnev uuring alates stimulatsiooni algusest LPS-ga nagu tehti ka käesolevas uuringus. Küll on varasemates uuringutes näidatud takroliimuse NO tootmist inhibeerivat toimet hiire J774 makrofaagides, soole epiteelrakkudes, silelihasrakkudes ning inimese keratinotsüütides [91,94,104]. LPS-i poolt indutseeritud J774 makrofaagides oli takroliimuse toime väga sarnane tsüklosporiini toimega, minimaalseks efektiivseks kontsentratsiooniks oli 1 μ M.

Takroliimuse ja tsüklosporiini toimemehhanism on toodud joonisel 9. Mõlema ravimi korral on toime peamiseks vahendajaks transkriptsioonifaktori NF-AT defosforüülmise vähendamine ja seeläbi pidurdub NF-AT translokatsioon rakutuumas. Kuigi on esitatud hüpotees, et NF-AT võiks reguleerida ka iNOS-i transkriptsiooni [92], ei ole sellist toimet eksperimentaalselt suudetud tõestada.

Takroliimuse terapeutiliseks vahemikuks on hinnatud täisveres 10-20 ng/ml ja vereplasmas 0,5-2 ng/ml. Keerulise jaotumise tõttu on takroliimuse verekontsentratsiooni peetud vaid surrogaatmarkeriks ravimi toime kohta organismis [105]. Käesoleva uurimistöö katsetes kasutatud kontsentratsioonid olid vahemikus 80,4-8040 ng/ml.

Takroliimuse pidurdas uuritavates kontsentratsioonides märkimisväärselt L-arginiini transporti. Samas oli takroliimuse toime doosist sõltuvus L-arginiini transpordi mõjustajana ebataoline – kõrgemates kontsentratsioonides ravimi L-arginiini transporti pidurdav toime nõrgenes. Kuna antud uuringus ei käsitletud täpsemalt seda, millisel tasemel ravimid L-arginiini transporti mõjutavad, ei ole sellise doosist sõltuvuse põhjus selge. Võimalik, et takroliimuse mõjutab L-arginiini transporti erinevatel tasemetel vastupidises suunas.

Kokkuvõtvalt saab öelda, et mõlemad uuritud kaltsineuriini inhibiitorid pidurdasid LPS-indutseeritud NO sünteesi ja L-arginiini transporti, kusjuures nende toime L-arginiini transpordile oli märgatavalt tugevam, kui NO sünteesile.

6.2.2. Deksametasooni efektid

Deksametasoon põhjustas LPS-stimuleeritud makrofaagides doosist sõltuva NO sünteesi pidurdumise kontsentratsioonides 0,01 μM - 1 μM (joonis 14). Saadud andmed on igati kooskõlas teaduskirjanduses varemavaldatud tulemustega. Glükokortikoidid on klassikaline ravimite grupp, mis pidurdavad NO tootmist aktiveeritud makrofaagides. Huvitav on siinkohal märkida, et LPS stimuleeritud nitritite ja nitraatide tootmist makrofaagide poolt kirjeldati juba ajal, kui NO bioloogilise molekulina oli tundmatu [106]. Glükokortikoidid olid pea esimene ravimigrupp, millel leiti võime pidurdada NO sünteesi aktiveeritud makrofaagides ja esimene selline uuring kasutas just deksametasooni [107]. Korduvalt on näidatud deksametasooni NO tootmist pärssivat toimet RAW 264.7 makrofaagides alates madalatest nanomolaarsetest kontsentratsioonidest [108]. Sarnaseid tulemusi on saadud nii erinevat tüüpi makrofaagides kui ka mitmetes teistes rakutüüpides [103,109,110]. Paradoksina ei ole siiski päris selge, millised on glükokortikoidide NO sünteesi vähendavat toimet vahendavad molekulaarsed mehhanismid. Arvatakse, et selline efekt põhineb eelkõige NF- κ B inhibeerimisel ja seeläbi iNOS-i geeni vähenenud transkriptsioonil, kuid leitud on ka iNOS-i mRNA stabiilsuse vähendamist ning iNOS-i valgu degradeerumise tõusu [111,80,109]. Ka glükokortikoidide pidurdav toime L-arginiini transpordile on varem kirjeldatud. LPS-stimuleeritud roti makrofaagide kultuuris põhjustas deksametasoon annustes 0,1 ja 1 μM märkimisväärse L-arginiini transpordi pidurdumise, mis oli paralleelne NO sünteesi inhibeerimisega [103]. Käesolevas uuringus oli deksametasooni L-arginiini transporti pidurdav toime pisut tugevam, kui toime NO sünteesile, ning tekkis madalamas kontsentratsioonis. Ka L-arginiini transpordi pidurdamise suurusjärg sarnanes käesolevas uurimistöös eelpoolnimetatud uuringus leituga, olles umbes 50% algtasemest. Kuigi NF- κ B osaleb ka arginiini transportvalkude geeniekspressiooni regulatsioonis, spekulatsioonid autorid, et deksametasooni toime L-arginiini transpordile võib olla vahendatud ka teiste faktorite poolt [103].

Samas on teist tüüpi makrofaagides (J774) kirjeldatud, et 10 μM deksametasoon pidurdab küll LPS-indutseeritud NO sünteesi, kuid mitte L-arginiini transporti [112]. Kuna glükokortikoidide toimet L-arginiini transpordile makrofaagides on suhteliselt vähe uuritud, on raske öelda, kas tõesti esinevad erinevate makrofagaalsete rakuliinide vahel nii suured erinevused, või on tegemist valenegatiivse leiuga. Arvestades, et glükokortikoidid

pidurdavad indutseeritud L-arginiini transporti ka väga erinevates rakutüüpides, nt endoteliaalsetes rakkudes [113], tuleb kindlasti kõne alla ka viimatimainitu.

Kokkuvõttes saab öelda, et meie katses pidurdas glükokortikoidide tüüpiline esindaja deksametasoon LPS-indutseeritud makrofaagides tugevalt nii L-arginiini transporti kui NO sünteesi.

6.2.3. Tetratsükliini efektid

Tetratsükliini rea ravimite hulka kuulub mitmeid keemiliselt sarnaseid molekule, peale tetratsükliini enese veel nt. doksütsükliin ja minotsükliin. Neist molekulidest on mitmeid uuritud ka seoses võimalike toimetega NO sünteesile.

RAW 264.7 makrofaagides ei ole tetratsükliini toimet varem uuritud. Siiski on näidatud, et nii minotsükliin kui doksütsükliin inhibeerivad doosist sõltuvalt NO sünteesi LPS-stimuleeritud RAW 264.7 makrofaagides [91]. LPS-stimuleeritud J774 makrofaagides pärssis tetratsükliin lämmastikmonooksiidi teket 125-250 μM kontsentratsioonides [87]. Käesolevas töös leiti, et tetratsükliinil on doosist sõltuv NO sünteesi pidurdav efekt RAW 264.7 makrofaagides väga lähedases doosivahemikus (50-300 μM , joonis 15). Ka NO sünteesi pidurduse määr oli viidatud uuringus sarnane käesoleva uuringu tulemusega. Tetratsükliinide toime NO sünteesile ei piirdu vaid makrofagaalse rea rakkudega. Nii on doksütsükliin võimeline pidurdama NO sünteesi stimuleeritud kopsuepiteeli rakkude [114] ja aktiveeritud kondrotsüütide poolt [91,84]. Huvitav on fakt, et tetratsükliin ja doksütsükliin on efektiivsed ka *in vivo* tingimustes, hoides ilmselt NO sünteesi pärssimise kaudu ära LPS-indutseeritud endotokseemia letaalsed efekti [86].

Tetratsükliini ja selle derivaatide NO sünteesi pidurdava toime taga arvatakse olevat iNOS-i mRNA-d destabiliseeriv toime [84,85].

Käesolevas uurimistöös pidurdas tetratsükliin märkimisväärselt ka L-arginiini transporti LPS-stimuleeritud makrofaagides. Maksimaalne pidurdav toime ilmnes juba kõige madalamas testitud kontsentratsioonis ja ei suurenenud ravimi kontsentratsiooni kasvades. Tetratsükliini või selle derivaatide toimet L-arginiini transpordile ei ole teaduskirjanduses varem kirjeldatud.

6.3. Kokkuvõte

Kõik uuritud immuunmodulaatorid põhjustasid LPS-aktiveeritud RAW 264.7 makrofaagides nii NO sünteesi kui ka L-arginiini transpordi pidurdumise. Enamike ravimite korral tekkis L-arginiini transpordi pidurdus madalamates kontsentratsioonides kui NO sünteesi pidurdus. Kuna mõne ravimi korral tekkis küll tugev L-arginiini transpordi pidurdumine, kuid suhteliselt tagasihoidlik langus NO sünteesis, võib väita, et L-arginiini transport stimuleeritud makrofaagides töötab märkimisväärse varuga ja ei peaks olema kriitiline tegur määramaks NO sünteesi aktiivsust.

Immuunmoduleerivate ravimite toimed L-arginiini/ NO süsteemile avaldusid valdavalt kliiniliselt relevantsetes kontsentratsioonides. Seega võib mõju L-arginiini/NO süsteemile osaleda nende ravimite kliinilistes toimetes.

Uuringu tulemused viitavad võimalusele, et L-arginiini transporti/ NO sünteesi aktiveeritud RAW 264.7 makrofaagides oleks võimalik kasutada ka mudelsüsteemina, testimaks uusi potentsiaalseid immuunmoduleerivate ravimite kandidaatmolekule.

7. JÄRELDUSED

1. Kõik uuritud immuunmoduleerivad ravimid pidurdasid LPS-stimuleeritud RAW 264.7 makrofaagides NO sünteesi. Kui takroliimus ja tsüklosporiin olid uuritud kontsentratsioonides nõrgad NO sünteesi inhibiitorid, siis deksametasoon ja tetratsükliin põhjustasid tugeva pidurduse.
2. Kõik uuritud ravimid pidurdasid ka L-arginiini transporti makrofaagidesse. Tüüpiliselt avaldus transporti pidurdav toime madalamates kontsentratsioonides, kui NO sünteesi pärssimine.

Mõju L-arginiini/NO süsteemile võib osaleda immuunmoduleerivate ravimite kliinilistes toimetes.

8. KIRJANDUS

1. Vallance, P and Leiper, J. (2002) Blocking NO synthesis: how, where and why? Nature Reviews Drug Discovery 1:939-950.
2. Palmer, RMJ; Ferrige, AG; and Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature 327:524-526.
3. Bredt, DS and Snyder, SH. (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. Proceedings of the National Academy of Sciences 87:682-685.
4. Xie, QW; Cho, HJ; Calaycay, J; Mumford, RA; Swiderek, KM; Lee, TD; Ding, A; Troso, T; and Nathan, C. (1992) Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. Science 256:225-228.
5. Wink, DA; Hanbauer, I; Grisham, MB; Laval, F; and Nims, R. (1996) Chemical biology of nitric oxide: regulation and protective and toxic mechanisms. Current Topics in Cellular Regulation 34:159-187.
6. Lin, AW; Chang, CC; and McCormick, CC. (1996) Molecular Cloning and Expression of an Avian Macrophage Nitric-oxide Synthase cDNA and the Analysis of the Genomic 5'-Flanking Region. Journal of Biological Chemistry 271:11911-11919.
7. Liepe, BA; Stone, C; Koistinaho, J; and Copenhagen, DR. (1994) Nitric oxide synthase in Muller cells and neurons of salamander and fish retina. Journal of Neuroscience 14:7641-7654.
8. Conte, A and Ottaviani, E. (1995) Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes. FEBS Letters 365:120-124.
9. Muller, U. (1994) Ca²⁺/Calmodulin-dependent Nitric Oxide Synthase in *Apis mellifera* and *Drosophila melanogaster*. European Journal of Neuroscience 6:1362-1370.

10. Ribeiro, JM; Hazzard, JM; Nussenzveig, RH; Champagne, DE; and Walker, FA. (1993) Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a bloodsucking insect. *Science* 260:539-541.
11. Ghigo, D; Todde, R; Ginsburg, H; Costamagna, C; Gautret, P; Bussolino, F; Ulliers, D; Giribaldi, G; Deharo, E; and Gabrielli, G. (1995) Erythrocyte stages of *Plasmodium falciparum* exhibit a high nitric oxide synthase (NOS) activity and release an NOS-inducing soluble factor. *The Journal of Experimental Medicine* 182:677-688.
12. Paveto, C; Pereira, C; Espinosa, J; Montagna, AE; Farber, M; Esteva, Mn; Flawib, MM; and Torres, HN. (1995) The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry* 270:16576-16579.
13. Golderer, G; Werner, ER; Leitner, S; Grobner, P; and Werner-Felmayer, G. (2001) Nitric oxide synthase is induced in sporulation of *Physarum polycephalum*. *Genes and Development* 15:1299-1309.
14. Charles, IG; Palmer, RMJ; Hickery, MS; Bayliss, MT; Chubb, AP; Hall, VS; Moss, DW; and Moncada, S. (1993) Cloning, Characterization and Expressions of a cDNA Encoding an Inducible Nitric Oxide Synthase from the Human Chondrocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:11419-11423.
15. Knowles, RG and Moncada, S. (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *The Biochemical journal* 298:249-258.
16. Kelley, TJ and Drumm, ML. (1998) Inducible Nitric Oxide Synthase Expression Is Reduced in Cystic Fibrosis Murine and Human Airway Epithelial Cells. *Journal of Clinical Investigation* 102:1200-1207.
17. Forstermann, U; Closs, EI; Pollock, JS; Nakane, M; Schwarz, P; Gath, I; and Kleinert, H. (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23:1121-1131.
18. Volke, V. (1999) Pharmacological and biochemical studies on nitric oxide in the regulation of behaviour. *Tartu Ülikooli doktoriväitekiri*

19. Alderton, WK; Cooper, CE; and Knowles, RG. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical journal* 357:593-615.
20. Lowry; Goldberg; and Belosevic. (1998) Induction of nitric oxide (NO) synthesis in murine macrophages requires potassium channel activity. *Clinical and Experimental Immunology* 111:597-603.
21. Griffith, OW and Stuehr, DJ. (1995) Nitric Oxide Synthases: Properties and Catalytic Mechanism. *Annual Review of Physiology* 57:707-734.
22. Masters, BS; McMillan, K; Sheta, EA; Nishimura, JS; Roman, LJ; and Martasek, P. (1996) Neuronal nitric oxide synthase, a modular enzyme formed by convergent evolution: structure studies of a cysteine thiolate-liganded heme protein that hydroxylates L-arginine to produce NO. as a cellular signal [published erratum appears in *FASEB J* 1996 Jul;10(9):1107]. *The FASEB Journal* 10:552-558.
23. Liu, SF; Adcock, IM; Old, RW; Barnes, PJ; and Evans, TW. (1996) Differential regulation of the constitutive and inducible nitric oxide synthase mRNA by lipopolysaccharide treatment in vivo in the rat. *Critical Care Medicine* 24:1219-1225.
24. Guoyao, W and Sidney, MM. (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *The Biochemical journal* 336:1-17.
25. Mori, M and Gotoh, T. (2000) Regulation of Nitric Oxide Production by Arginine Metabolic Enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 275:715-719.
26. Gobert, AP; McGee, DJ; Akhtar, M; Mendz, GL; Newton, JC; Cheng, Y; Mobley, HLT; and Wilson, KT. (2001) *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: A strategy for bacterial survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:13844-13849.
27. Iniesta, V; Gomez-Nieto, LC; and Corraliza, I. (2001) The Inhibition of Arginase by N ω -Hydroxy-L-Arginine Controls the Growth of *Leishmania* Inside Macrophages. *The Journal of Experimental Medicine* 193:777-784.

28. Martin, L; Comalada, M; Marti, L; Closs, EI; MacLeod, CL; Martin del Rio, R; Zorzano, A; Modolell, M; Celada, A; Palacin, M; and Bertran, J. (2006) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases L-arginine transport through the induction of CAT2 in bone marrow-derived macrophages. *AJP - Cell Physiology* 290:C1364-C1372.
29. Jenkinson, C; Grody, W; and Cederbaum, S. (1996) Comparative properties of arginases. *Comparative Biochemistry and Physiology* 114:107-132.
30. Gotoh, T and Mori, M. (1999) Arginase II Downregulates Nitric Oxide (NO) Production and Prevents NO-mediated Apoptosis in Murine Macrophage-derived RAW 264.7 Cells. *The Journal of Cell Biology* 144:427-434.
31. Buga, GM; Singh, R; Pervin, S; Rogers, N; Schmitz, D; Jenkinson, C; Cederbaum, S; and Ignarro, LJ. (1996) Arginase activity in endothelial cells: inhibition by NG-hydroxy-L-arginine during high-output NO production. *American Journal of Physiology* 271:1988-1998.
32. Suschek, C; Schnorr, O; and Kolb, V. (2004) The Role of iNOS in Chronic Inflammatory Processes In Vivo: Is it Damage-Promoting, Protective, or Active at all? *Current Molecular Medicine* 4:763-775.
33. Denninger, JW and Marletta, MA. (1999) Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Bioenergetics* 1411:334-350.
34. Peng, HB; Spiecker, M; and Liao, JK. (1998) Inducible Nitric Oxide: An Autoregulatory Feedback Inhibitor of Vascular Inflammation. *The Journal of Immunology* 161:1970-1976.
35. Stamler, J; Lamas, S; and Ferric, F. (2001) Nitrosylation, the Prototypic Redox-Based Signaling Mechanism. *Cell* 106:675-683.
36. Ignarro, LJ; Cirino, G; Casini, A; and Napoli, C. (1999) Nitric Oxide as a Signaling Molecule in the Vascular System: An Overview. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 34:879-886.

37. Kröncke, K-D; Fehsel, K; Suschek, C; and Kolb-Bachofen, V. (2001) Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. *International Immunopharmacology* 1:1407-1420.
38. Fukumura, D; Kashiwagi, S; and Jain, RK. (2006) The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 6:521-534.
39. Hanafy K A; Krumenacker J S; and Murad F. (2001) NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Medical Science Monitor* 7:801-819.
40. Walford, G and Loscalzo, J. (2003) Nitric oxide in vascular biology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 1:2112-2118.
41. Gewaltig, MT and Kojda, G. (2002) Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovascular Research* 55:250-260.
42. Huang, PL; Huang, Z; Mashimo, H; Bloch, K; Moskowitz, MA; Bevan, J; and Fishman, MC. (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377:239-242.
43. Michelson, AD; Benoit, SE; Furman, MI; Breckwoldt, WL; Rohrer, MJ; Barnard, MR; and Loscalzo, J. (1996) Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins. *AJP - Heart and Circulatory Physiology* 270:H1640-H1648.
44. Yan, Zq; Yokota, T; Zhang, W; and Hansson, GK. (1996) Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibits Platelet Adhesion and Restores Blood Flow in the Injured Artery. *Circulation Research* 79:38-44.
45. Kubes, P; Suzuki, M; and Granger, DN. (1991) Nitric Oxide: An Endogenous Modulator of Leukocyte Adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88:4651-4655.
46. Valtschanoff, JG; Weinberg, RJ; Rustioni, A; and Schmidt, HHHW. (1995) Colocalization of neuronal nitric oxide synthase with GABA in rat cuneate nucleus. *Journal of Neurocytology* V24:237-245.
47. Hara, H; Waeber, C; P.L.H.; Fujii, M; Fishman, MC; and Moskowitz, MA. (1996) Brain distribution of nitric oxide synthase in neuronal or endothelial nitric oxide

- synthase mutant mice using [3H]l-NG-nitro-arginine autoradiography. *Neuroscience* 75:881-890.
48. Salter, M; Duffy, C; Garthwaite, J; and Strijbos, PJLM. (1996) Ex Vivo Measurement of Brain Tissue Nitrite and Nitrate Accurately Reflects Nitric Oxide Synthase Activity In Vivo. *Journal of Neurochemistry* 66:1683-1690.
 49. Narendra, T; Mahesh, C; Renu, T; and Mithilesh, K. (2004) Nitric Oxide as a Unique Bioactive Signaling Messenger in Physiology and Pathophysiology. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 4:227-237.
 50. Keelan, JA; Mitchell, MD; and Czech, DA. (1998) A Nitric Oxide Synthase Inhibitor NG-Nitro-l-Arginine, Attenuates Glucoprivic Feeding and Deprivation-Induced Drinking in the Mouse - Relation to specific changes in the microstructure of feeding behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 60:601-607.
 51. Guimaraes, F; Beijamini, V; Moreira, F; Aguiar, D; and de Lucca, A. (2005) Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 29:1313-1322.
 52. Itzhak, Y; Syed, FA; Julio, LM; Black, MD; and Paul, LH. (1998) Resistance of neuronal nitric oxide synthase-deficient mice to cocaine-induced locomotor sensitization. *Psychopharmacology* V140:378-386.
 53. Daniel, H; Hemart, N; Jaillard, D; and Crepel, F. (1993) Long-term Depression Requires Nitric Oxide and Guanosine 3':5'Cyclic Monophosphate Production in Rat Cerebellar Purkinje Cells. *European Journal of Neuroscience* 5:1079-1082.
 54. Sarchielli, P; Alberti, A; Floridi, A; and Gallai, V. (2002) L-Arginine/nitric oxide pathway in chronic tension-type headache: relation with serotonin content and secretion and glutamate content. *Journal of the neurological sciences* 198:9-15.
 55. Lassen, LH; Ashina, M; Christiansen, I; Ulrich, V; Grover, R; Donaldson, J; and Olesen, J. (1998) Nitric oxide synthase inhibition: a new principle in the treatment of migraine attacks. *Cephalalgia* 18:27-32.

56. McCann, SM; Licinio, J; Wong, M-L; Yu, WH; Karanth, S; and Rettorri, V. (1998) The nitric oxide hypothesis of aging. *Experimental Gerontology* 33:813-826.
57. van der Veen, R. (2001) Nitric oxide and T helper cell immunity. *International Immunopharmacology* 1:1491-1500.
58. Cifone, MG; Ulisse, S; and Santoni, A. (2001) Natural killer cells and nitric oxide. *International Immunopharmacology* 1:1513-1524.
59. Armstrong, R. (2001) The physiological role and pharmacological potential of nitric oxide in neutrophil activation. *International Immunopharmacology* 1:1501-1512.
60. Bogdan, C. (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2:907-916.
61. Niedbala, W; Wei, XQ; Piedrafita, D; and Liew, FY. (1999) Effects of nitric oxide on the induction and differentiation of Th1 cells. *European Journal of Immunology* 29:2498-2505.
62. Thoma-Uszynski, S; Stenger, S; Takeuchi, O; Ochoa, MT; Engele, M; Sieling, PA; Barnes, PF; Rollinghoff, M; Bolcskei, PL; Wagner, M; Akira, S; Norgard, MV; Belisle, JT; Godowski, PJ; Bloom, BR; and Modlin, RL. (2001) Induction of Direct Antimicrobial Activity Through Mammalian Toll-Like Receptors. *Science* 291:1544-1547.
63. Lefer, DJ; Jones, SP; Girod, WG; Baines, A; Grisham, MB; Cockrell, AS; Huang, PL; and Scalia, R. (1999) Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *AJP - Heart and Circulatory Physiology* 276:H1943-H1950.
64. Bohle, DS. (1998) Pathophysiological chemistry of nitric oxide and its oxygenation by-products. *Current Opinion in Chemical Biology* 2:194-200.
65. Holan, V; Krulova, M; Zajcova, A; and Pindjakova, J. (2002) Nitric oxide as a regulatory and effector molecule in the immune system. *Molecular Immunology* 38:989-995.
66. Fang, FC and Vazquez-Torres, A. (2002) Nitric oxide production by human macrophages: there's NO doubt about it. *AJP - Lung Cellular and Molecular Physiology* 282:L941-L943.

67. Boutlis, CS; Hobbs, MR; Marsh, RL; Misukonis, MA; Tkachuk, AN; Lagog, M; Booth, J; Granger, DL; Bockarie, MJ; Mgone, CS; Levesque, MC; Weinberg, JB; and Anstey, NM. (2003) Inducible nitric oxide synthase (NOS2) promoter ccttt repeat polymorphism: relationship to *in vivo* nitric oxide production/NOS activity in an asymptomatic malaria-endemic population. *Am J Trop Med Hyg* 69:569-573.
68. Forsythe, P; Gilchrist, M; Kulka, M; and Befus, AD. (2001) Mast cells and nitric oxide: control of production, mechanisms of response. *International Immunopharmacology* 1:1525-1541.
69. Wei, Xq; Charles, IG; Smith, A; Ure, J; Feng, Gj; Huang, Fp; Xu, D; MullersWerner; Moncada, S; and Liew, FY. (1995) Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 375:408-411.
70. Veen, vd; Dietlin, TA; Dixon, GJ; and Gilmore, W. (2000) Macrophage-Derived Nitric Oxide Inhibits the Proliferation of Activated T Helper Cells and Is Induced during Antigenic Stimulation of Resting T Cells. *Cellular Immunology* 199:43-49.
71. Barnes, PJ and Liew, FY. (1995) Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunology Today* 16:128-130.
72. Bogdan, C. (1998) The Multiplex Function of Nitric Oxide in (Auto)immunity. *The Journal of Experimental Medicine* 187:1361-1365.
73. Ross, R and Reske-Kunz, AB. (2001) The role of NO in contact hypersensitivity. *International Immunopharmacology* 1:1469-1478.
74. Blasko, E. (2002) Mechanistic studies with potent and selective inducible nitric oxide synthase dimerization inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* 277:295-302.
75. Wolff, D; Datto, G; and Samatovicz, R. (1993) The dual mode of inhibition of calmodulin-dependent nitric oxide synthase by antifungal imidazole agents. *Journal of Biological Chemistry* 268:9430-9436.
76. Schoneveld, O; Gaemers, I; and Lamers, W. (2004) Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochemical and Biophysical Acta* 1680:114-128.

77. Newton, R. (2000) Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax* 55:603-613.
78. Di Rosa, M; Radomski, MW; Carnuccio, R; and Moncada, S. (1990) Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 172:1246-1252.
79. Radomski, MW; Palmer, RMJ; and Moncada, S. (1990) Glucocorticoids Inhibit the Expression of an Inducible, but not the Constitutive, Nitric Oxide Synthase in Vascular Endothelial Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87:10043-10047.
80. Guo, F; Raeve, H; Rice, T; Stuehr, DJ; Thunnissen, F; and Erzurum, S. (1995) Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:7809-7813.
81. Sapadin, AN and Fleischmajer, R. (2006) Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. *54:258-265*.
82. Shapira, L; Soskolne, WA; Hourri, Y; Barak, V; Halabi, A; and Stabholz, A. (1996) Protection against endotoxic shock and lipopolysaccharide-induced local inflammation by tetracycline: correlation with inhibition of cytokine secretion. *Infection and Immunity* 64:825-828.
83. Golub, LM; Ramamurthy, NS; McNamara, TF; Greenwald, RA; and Rifkin, BR. (1991) Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs. *Critical Reviews in Oral Biology Medicine* 2:297-321.
84. Amin, A; Attur, M; Thakker, G; Patel, P; Vyas, P; Patel, R; Patel, I; and Abramson, S. (1996) A novel mechanism of action of tetracyclines: Effects on nitric oxide synthases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:14014-14019.
85. D'Agostino, P; Ferlazzo, V; Milano, S; La Rosa, M; Di Bella, G; Caruso, R; Barbera, C; Grimaudo, S; Tolomeo, M; Feo, S; and Cillari, E. (2001) Anti-inflammatory effects of chemically modified tetracyclines by the inhibition of nitric oxide and

- interleukin-12 synthesis in J774 cell line. *International Immunopharmacology* 1:1765-1776.
86. Milano, S; Arcoleo, F; D'Agostino, P; and Cillari, E. (1997) Intraperitoneal injection of tetracyclines protects mice from lethal endotoxemia downregulating inducible nitric oxide synthase in various organs and cytokine and nitrate secretion in blood. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41:117-121.
 87. D'Agostino, P; Arcoleo, F; Barbera, C; Di Bella, G; La Rosa, M; Misiano, G; Milano, S; Brai, M; Cammarata, G; Feo, S; and Cillari, E. (1998) Tetracycline inhibits the nitric oxide synthase activity induced by endotoxin in cultured murine macrophages. *European Journal of Pharmacology* 346:283-290.
 88. Kroczeck, RA; Black, CD; Barbet, J; and Shevach, EM. (1987) Mechanism of action of cyclosporin A in vivo. I. Cyclosporin A fails to inhibit T lymphocyte activation in response to alloantigens. *The Journal of Immunology* 139:3597-3603.
 89. Smith, S; Terminelli, C; Kenworthy-Bott, L; and Phillips, D. (1991) A study of cytokine production in acute graft-vs-host disease. *Cellular Immunology* 134:336-348.
 90. Holschermann, H; Durfeld, F; Maus, U; Bierhaus, A; Heidinger, K; Lohmeyer, J; Nawroth, PP; Tillmanns, H; and Haberbosch, W. (1996) Cyclosporine a inhibits tissue factor expression in monocytes/macrophages. *Blood* 88:3837-3845.
 91. Attur, MG; Patel, R; Thakker, G; Vyas, P; Levartovsky, D; Patel, P; Naqvi, S; Raza, R; Patel, K; Abramson, D; Bruno, G; Abramson, SB; and Amin, AR. (2000) Differential anti-inflammatory effects of immunosuppressive drugs: cyclosporin, rapamycin and FK-506 on inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, cyclooxygenase-2 and PGE-2 production. *Inflammation Research* V49:20-26.
 92. Hamalainen, M; Lahti, A; and Moilanen, E. (2002) Calcineurin inhibitors, cyclosporin A and tacrolimus inhibit expression of inducible nitric oxide synthase in colon epithelial and macrophage cell lines. *European Journal of Pharmacology* 448:239-244.

93. Conde, M; Andrade, J; Bedoya, F; Santa Maria, C; and Sobrino, F. (1995) Inhibitory effect of cyclosporin A and FK506 on nitric oxide production by cultured macrophages. Evidence of a direct effect on nitric oxide synthase activity. *Immunology* 84:476-481.
94. Dusting, GJ; Akita, K; Hickey, H; Smith, M; and Gurevich, V. (1999) Cyclosporin A and tacrolimus (FK506) suppress expression of inducible nitric oxide synthase in vitro by different mechanisms. *British Journal of Pharmacology* 128:337-344.
95. Moffatt, S; Cockman, M; and Metcalfe, M. (2000) STAT 6 up-regulation by FK506 in the presence of interleukin-4. *Transplantation* 69:1521-1523.
96. Hortelano, S; Lopez-Collazo, E; and Bosca, L. (1999) Protective effect of cyclosporin A and FK506 from nitric oxide-dependent apoptosis in activated macrophages. *British Journal of Pharmacology* 126:1139-1146.
97. Kaminska, B; Gaweda-Walerych, K; and Zawadzka, M. (2004) Molecular mechanisms of neuroprotective action of immunosuppressants - facts and hypotheses. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 8:45-58.
98. Sun, J; Zhang, X; Broderick, M; and Fein, H. (2003) Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. *Sensors* 3:276-284.
99. Signorello, MG; Pascale, R; and Leoncini, G. (2003) Transport of L-arginine and nitric oxide formation in human platelets. *FEBS Journal* 270:2005-2012.
100. Lowry, OH; Rosebrough, NJ; Farr, AL; and Randall, RJ. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275.
101. Amir, A; Chapman, S; Kadar, T; Gozes, Y; Sahar, R; and Allon, N. (2000) Sulfur mustard toxicity in macrophages: effect of dexamethasone. *Journal of Applied Toxicology* 1:S51-S58.
102. Farghali, H; Canova, N; Kucera, T; Martinek, J; and Mašek, K. (2003) Nitric oxide synthase inhibitors modulate lipopolysaccharide-induced hepatocyte injury:

- dissociation between in vivo and in vitro effects. *International Immunopharmacology* 3:1627-1638.
103. Hammermann, R; Dreissig, MDM; Mossner, J; Fuhrmann, M; Berrino, L; Gothert, M; and Racke, K. (2000) Nuclear Factor-kappa B Mediates Simultaneous Induction of Inducible Nitric-Oxide Synthase and Up-Regulation of the Cationic Amino Acid Transporter CAT-2B in Rat Alveolar Macrophages. *Molecular Pharmacology* 58:1294-1302.
 104. Lan, CCE; Kao, YH; Huang, SM; Yu, HS; and Chen, GS. (2004) FK506 independently upregulates transforming growth factor beta and downregulates inducible nitric oxide synthase in cultured human keratinocytes: possible mechanisms of how tacrolimus ointment interacts with atopic skin. *British Journal of Dermatology* 151:679-684.
 105. Undre, NA. (2003) Pharmacokinetics of tacrolimus-based combination therapies. *Nephrology Dialysis Transplantation* 18:i12-i15.
 106. Stuehr, DJ and Marletta, MA. (1985) Mammalian Nitrate Biosynthesis: Mouse Macrophages Produce Nitrite and Nitrate in Response to Escherichia coli Lipopolysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82:7738-7742.
 107. Thomsen, L; Ching, L; and Baguley, B. (1990) Evidence for the Production of Nitric Oxide by Activated Macrophages Treated with the Antitumor Agents Flavone-8-acetic Acid and Xanthenone-4-acetic Acid. *Cancer Research* 50:6966-6970.
 108. Walker, G; Pfeilschifter, J; and Kunz, D. (1997) Mechanisms of suppression of inducible nitric-oxide synthase (iNOS) expression in interferon (INF)-gamma-stimulated RAW 264.7 cells by dexamethasone. Evidence for glucocorticoid-induced degradation of iNOS protein by calpain as a key step in post-transcriptional regulation. *Journal of Biological Chemistry* 272:16679-16687.
 109. Korhonen, R; Lahti, A; Hamalainen, M; Kankaanranta, H; and Moilanen, E. (2002) Dexamethasone Inhibits Inducible Nitric-Oxide Synthase Expression and Nitric

Oxide Production by Destabilizing mRNA in Lipopolysaccharide-Treated Macrophages. *Molecular Pharmacology* 62:698-704.

110. Donnelly, LE and Barnes, PJ. (2002) Expression and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase from Human Primary Airway Epithelial Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 26:144-151.
111. Fechir, M; Linker, K; Pautz, A; Hubrich, T; Förstermann, U; Rodriguez-Pascual, F; and Kleinert, H. (2005) Tristetraprolin regulates the expression of the human inducible nitric oxide synthase gene. *Molecular Pharmacology* 67:2148-2161.
112. Assreuy, J; Cunha, F; Liew, F; and Moncada, S. (1993) Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *British Journal of Pharmacology* 108:833-837.
113. Simmons, WW; Ungureanu-Longrois, D; Smith, GK; Smith, TW; and Kelly, RA. (1996) Glucocorticoids Regulate Inducible Nitric Oxide Synthase by Inhibiting Tetrahydrobiopterin Synthesis and L-Arginine Transport. *Journal of Biological Chemistry* 271:23928-23937.
114. Hoyt, JC; Ballering, J; Numanami, H; Hayden, JM; and Robbins, RA. (2006) Doxycycline Modulates Nitric Oxide Production in Murine Lung Epithelial Cells. *The Journal of Immunology* 176:567-572.

9. SUMMARY IN ENGLISH

The current master thesis investigated the effects of immunomodulating drugs on nitric oxide (NO) production and L-arginine uptake in lipopolysaccharide (LPS) stimulated murine macrophages.

The small gaseous molecule NO has been recently discovered to be a significant signaling molecule functioning in different mammalian tissues. NO is synthesized from an amino acid L-arginine by NO synthase (NOS). Three isotypes of NOS have been described. The inducible isoform of NOS (iNOS) is seen in macrophages after stimulation by various substances (LPS, interferon γ , interleukin 4 etc). Macrophages use NO mostly for their defense mechanisms. Various immunosuppressant drugs have been shown to affect NO production by macrophages. As NO synthesis by macrophages is also influenced by the availability of L-arginine it is of interest whether L-arginine transport parallels with NO production.

The aim of the study was to characterize the impact of dexamethasone, cyclosporine A, tacrolimus and tetracycline on NO production and L-arginine uptake in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages.

The effects of the drugs were measured by coincubation with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) during 24 hours. Cell viability was estimated by an analogue of XTT assay (CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega), total nitrate and nitrite accumulation was measured by Griess method, [^3H]-labeled-L-arginine uptake was measured during 15 minutes after 24-hours stimulation and was normalized for protein content measured according to the Lowry method.

Statistical analysis was performed by one way ANOVA followed by Newman-Keuls test or by Mann-Whitney *U* test when appropriate.

The drugs used did not affect the viability of cells except the highest concentration of dexamethasone (1000 nM).

All the drugs suppressed production of NO in LPS-activated murine macrophages. L-arginine transport was also inhibited by the immunomodulators already in lower concentration than needed to inhibit the production of NO.

We conclude that the effects of immunomodulating drugs on L-arginine /NO system may be involved in their clinical effects.

TÄNUAVALDUSED

Töö autor tänab juhendajat hindamatu abi, asjalike soovitude ja piiramatul kannatlikkuse eest, mille puudumisel oleks olnud töö valmimine samahästi kui võimatu.