

## ĮVAIRIŲ INDUKTORIŲ POVEIKIS AZOTO OKSIDO GAMYBAI GALVIJŲ PERIFERINIO KRAUJO MONOCITUOSE/MAKROFAGOCITUOSE *in vitro*

Juozas Pieškus<sup>1</sup>, Rimantas Stakauskas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Vilniaus universiteto Imunologijos institutas, Molėtų pl. 29, LT-2021 Vilnius; tel. 469249;

<sup>2</sup>Lietuvos veterinarijos akademija, Tilžės g. 18, LT-3022 Kaunas; tel./faks. 8-36 362844

**Santrauka.** Azoto oksidą (NO) gamina daugelis organizmo ląstelių, bet daugiausia – monocitai/makrofagocitai. NO gamybai sužadinti *in vitro* reikia stimuliatorių. Šio darbo tikslas buvo nustatyti įvairių induktorių [rekombinantinio gama interferono (IFN $\gamma$ , "Inflagenas"), ConA, PWM, LPS, SEB, SEA] įtaką NO gamybai galvijų periferinio kraujo monocituose/makrofagocituose, inkubuotose 3 paras ir 6 paras. Nustatyta, kad IFN $\gamma$  ("Inflageno") poveikis NO gamybai buvo greitesnis ir trumpas: jis pasireiškė 3 paras inkubuotose ląstelėse, o po 6 parų inkubavimo NO nebuvo padaugėję. Limfocitų mitogenų (ConA, LPS, PWM) poveikis NO gamybai skyrėsi. Labiausiai iš jų NO gamybą stimuliuavo ConA ir PWM, o LPS įtaka buvo neryški. Vis dėlto labiausiai NO gamybą monocituose/makrofagocituose stimuliuavo superantigenai – *Staphylococcus aureus* enterotoksinais A ir B (SEA ir SEB), ypač ląstelėse, inkubuotose 6 paras. Skirtingas įvairių induktorių poveikis NO gamybai galvijų periferinio kraujo monocituose/makrofagocituose siejamas su citokinų funkcija.

**Raktažodžiai:** azoto oksidas (NO), IFN $\gamma$ , PWM, LPS, SEB, SEA, monocitai, makrofagocitai, galvijai.

## THE INFLUENCE OF DIFFERENT INDUCTORS ON NITRIC OXIDE PRODUCTION BY BOVINE PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES/ MACROPHAGES *in vitro*

**Summary.** Most cells of the organism can produce nitric oxide (NO) but monocytes/macrophages are most potent producers. Different stimulators are needed for NO induction *in vitro*. The aim of this work was to investigate the influence of different stimuli (IFN $\gamma$ , ConA, PWM, LPS, SEB, SEA) on the production of NO by peripheral blood monocytes/macrophages after 3 and 6 days of incubation *in vitro*. The strongest effect of IFN $\gamma$  was found after 3 days of incubation. Mitogens had different effect on NO production. ConA and PWM had strong effects, meanwhile LPS was a weak NO inducer. Superantigens - *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B (SEA and SEB) were most potent inducers of NO production by monocytes/macrophages *in vitro* especially after 6 days of incubation. The influence of different cytokines on NO production by bovine peripheral blood monocytes/macrophages *in vitro* is discussed.

**Keywords:** Nitric oxide (NO), IFN $\gamma$ , PWM, LPS, SEB, SEA, monocytes, macrophages, cattle.

**Įvadas.** Kraujo monocitai ir audinių makrofagocitai, priklausantys vienabranduolių fagocitų sistamai, atlieka svarbų vaidmenį, saugodami organizmą nuo mikroorganizmų ir kitų patogenų. Be fagocitinės funkcijos, makrofagocitai dalyvauja pristatant antigeną, sintetina citokinus (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ ) bei reaktyviųjų formų deguonį ir azotą (MacMicking J. et al., 1997, Tizard I., 2000). Normalios fiziologinės būsenos imuninėje sistemoje NO veikia kaip imunoregulatorius, t.y. gali aktyvinti arba slopinti imuninį atsaką (Fang F. C. et al., 1997 Bogdan Ch. Et al., 2000). NO labai svarbus imunitetui prieš bakterijas (Alam M.S. et al., 2002). NO sintetinamas iš amino rūgšties L-arginino, veikiant fermentui azoto oksido sintetazei (NOS). Reakcijoje dalyvauja molekulinis deguonis, nikotinamid-adenin-dinukleotido fosfatas (NADPH) ir katalizatoriai (MacMicking J. et al., 1997). Žinomos dvi pagrindinės NOS izoformų grupės: 1) pastovioji NOS, priklausoma nuo kalcio (Ca<sup>++</sup>) (Bogdan Ch., 2000). Jai priklauso endotelinė (eNOS) ir neuronų (nNOS) NOS, kurių šiek tiek visada būna ląstelėse, ir 2) indukcinė NOS (iNOS), nepriklausoma nuo kalcio. Jos paprastai nebūna makrofaguose ir kitose ląstelėse, bet ji pradeda sintetinti suaktyvinus ląsteles.

NO gamina daugelis organizmo ląstelių, bet bene daugiausia – monocitai/makrofagocitai (Yui Y. et al.,

1991; Taylor-Robinson A. E., 1994). Įvairių NO induktorių veikimas nėra pakankamai išnagrinėtas, o kai kurie literatūros duomenys esti prieštaringi. Be to, NO gamyba monocituose/makrofagocituose labai skiriasi, atsižvelgiant į gyvūno rūšį (Adler H. et al., 1995).

**Darbo tikslas** – nustatyti įvairių induktorių poveikį NO gamybai galvijų periferinio kraujo monocituose/makrofagocituose *in vitro*.

**Medžiagos ir tyrimo metodai.** Tyrimams kraujo, naudojant antikoagulantą natrio etilendiamino tetraacetatą (NaEDTA), imta iš kliniškai sveikų Lietuvos juodmargių veislės pieninio tipo karvių (n=5) jungo venos. Iš viso iširti 576 mėginiai, kurie kartoti 4 kartus.

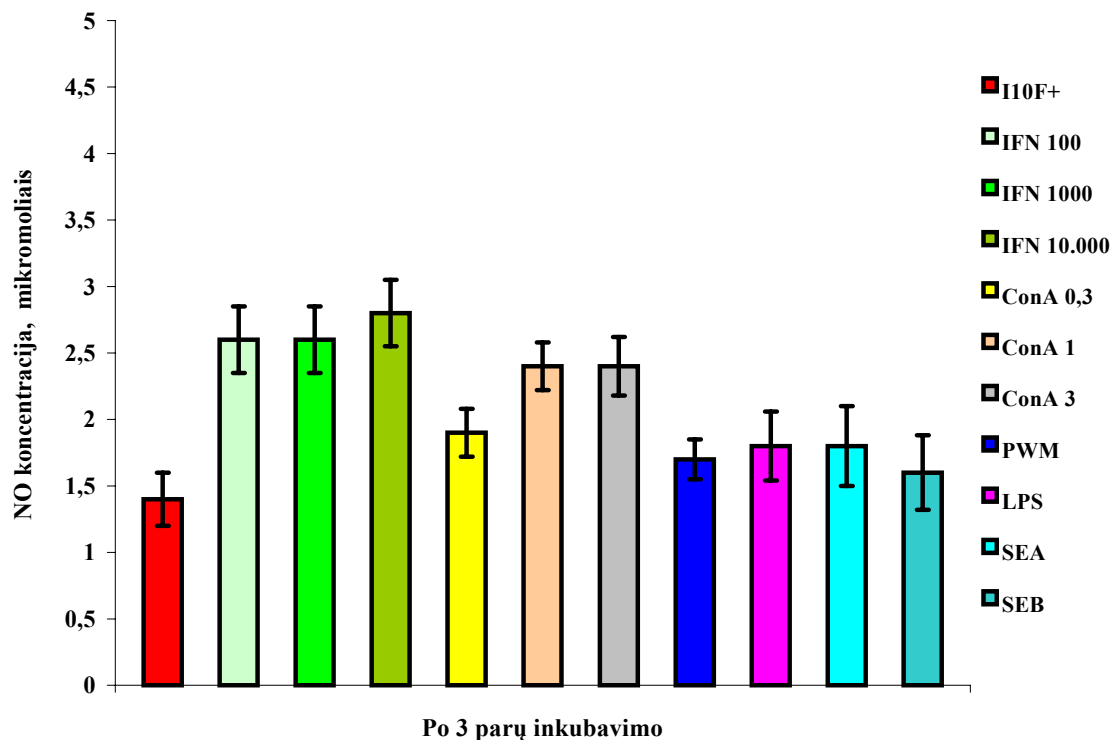
**Periferinio kraujo vienabranduolių ląstelių (MNC) išskyrimas.** Kraujas skiestas steriliu fosfatiniu buferiu (PBS, "Biochrom", Vokietija) santykiu 1:2 ir centrifuguotas tankio gradientu "Pancoll-Isopaque" ("PAA", Austrija) 30 min. 1000xg greičiu 10 °C temperatūroje (Mikalauskienė G., Pieškus J., 1997). Sterilia pipete iš interfazės ištrauktos išcentrifuguotos MNC ląstelės du kartus plautos PBS tirpalu (10 min., 4 °C temperatūroje, 500xg ir 250xg). Taip išskirtos ląstelės inkubuotos su stimulatoriais. Ląstelių gyvybingumas nustatytas 0,1 % tripano mėliu ("EGA-Chemie", Vokietija) ir buvo ne mažesnis kaip 95 %. MNC ląstelės skiestos

I10F<sup>+</sup> terpe, kad galutinė jų koncentracija būtų  $2 \times 10^5$ /ml, ir išpilstytos po 100  $\mu$ l į dvi "U" raudės pavidalo 96 duobučių plokšteles. Po to pridėta atitinkamos koncentracijos stimuliatorių: IFN $\gamma$  (Inflagenas "Biofa", Lietuva) po 100 TV, 1000 TV ir 10000 TV; Konkanavalino (ConA) – po 3  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml ir 0,3  $\mu$ g/ml; Pokvid ("Pokeweed") mitogeno (PWM) – 1  $\mu$ g/ml; *Staphylococcus aureus* enterotoksino B (SEB) – 100 ng/ml ir *Staphylococcus aureus* enterotoksino A (SEA) – 1 ng/ml. Plokštelės su ląstelėmis inkubuotos 37 °C temperatūroje 5 % CO<sub>2</sub> aplinkoje. Viena plokštelė inkubuota 3 paras, kita – 6 paras.

MNC pagamintas NO ląstelių kultūroje oksiduojasi į nitritą (NO<sub>2</sub>). NO<sub>2</sub> koncentracija terpėje matuota kolorimetriškai, naudojant Griso reagentą.

Tyrimų rezultatai apdoroti *GraphPad PRISM* programa (Motulsky H.J. et al., 1994–1995). Apskaičiuoti aritmetiniai vidurkiai, standartiniai nuokrypiai ir patikimumo koeficientai. Duomenys laikyti patikimi, kai  $p < 0,05$ .

**Tyrimų rezultatai.** Tiriant IFN $\gamma$  ("Inflageno") stimuliuojamąjį poveikį NO gamybai 3 paras inkubuotose monocituose/makrofagocituose, nustatyta, kad, nesvarbu kokios koncentracijos, IFN $\gamma$  stimuliuoja NO gamybą nuo  $2,4 \pm 0,25$   $\mu$ M iki  $2,8 \pm 0,24$   $\mu$ M ( $p < 0,05$ ). 6 paras su IFN $\gamma$  inkubuotose ląstelėse NO nepadaugėjo (1, 2 pav.).



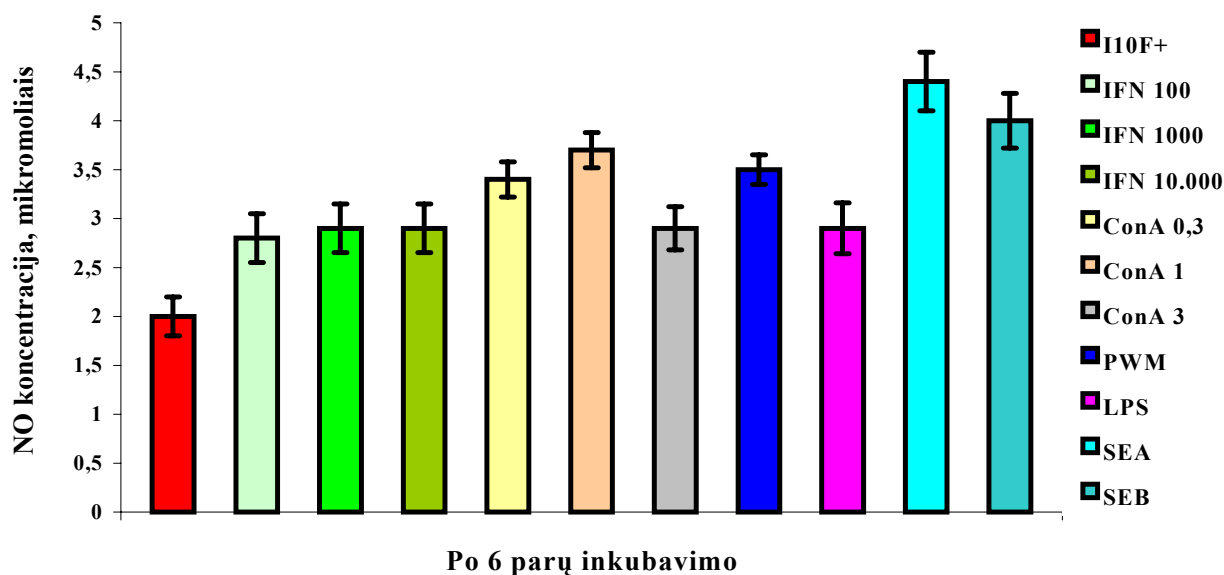
1 pav. Azoto oksido koncentracija po 3 parų inkubavimo

Limfocitų mitogenų (ConA, LPS ir PWM) poveikis NO gamybai monocituose/makrofagocituose. Nustatyta, kad 3 paras su ConA inkubuotose monocituose/makrofagocituose NO gamyba padidėjo nuo  $1,9 \pm 0,18$   $\mu$ M iki  $2,4 \pm 0,22$   $\mu$ M ( $p < 0,05$ ) ir tiesiogiai priklausė nuo ConA koncentracijos. 6 paras inkubuotose ląstelėse NO dar padaugėjo, bet jo gamyba taip neaplikaušė nuo mitogeno koncentracijos. Mažesnės koncentracijos limfocitų mitogenai NO gamybą stimuliuoja kaip ir didesnės koncentracijos limfocitų mitogenai: 0,3  $\mu$ g/ml Con A –  $3,4 \mu\text{M} \pm 0,1$  ( $p < 0,05$ ), 1  $\mu$ M/ml ConA –  $3,7 \pm 0,12$   $\mu$ M ( $p < 0,05$ ), o 3  $\mu$ M/ml ConA –  $2,9 \pm 0,12$   $\mu$ M ( $p < 0,05$ ).

PWM ir LPS mitogenų poveikis NO gamybai buvo neryškus. 3 paras inkubuotose ląstelėse PWM stimuliuoja

NO gamybą tik  $1,7 \pm 0,17$   $\mu$ M ( $p < 0,05$ ), LPS –  $1,8 \pm 0,15$   $\mu$ M. 6 paras inkubuotose ląstelėse statistiškai patikimai NO gamyba buvo padidėjusi tik nuo PWM poveikio –  $3,5 \mu\text{M} \pm 0,05$  ( $p < 0,05$ ), o LPS įtaka buvo nedidelė –  $2,9 \mu\text{M} \pm 0,26$  ( $p > 0,05$ ).

Superantigenų (SEA ir SEB) įtaka NO gamybai tiesiogiai priklausė nuo inkubavimo trukmės: kuo ilgiau buvo inkubuojama, tuo daugiau pasigamino NO. Stimuliuojama SEB superantigeno, NO gamyba padidėjo nuo  $1,6 \pm 0,07$   $\mu$ M (po 3 parų) iki  $4,0 \pm 0,09$   $\mu$ M (po 6 parų) ( $p < 0,05$ ), o stimuliuojama SEA antigeno, NO gamyba padidėjo atitinkamai nuo  $1,8 \pm 0,09$   $\mu$ M iki  $4,4 \pm 0,18$   $\mu$ M ( $p < 0,05$ ).



2 pav. Azoto oksido koncentracija po 6 parų inkubavimo

**Tyrimo rezultatų apibendrinimas.** Azoto oksidas yra labai nepatvarus junginys, kuris gaminasi veikiant fermentui azoto oksido sintazei (NOS). Nors pats azoto oksidas nėra labai toksiškas, bet jis gali reaguoti su superoksido anijonais ir gaminti labai toksiškus junginius:  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{ONOO}^-$  ir kt. Šie junginiai gali sunaikinti ląstelių išorėje ir viduje esančias bakterijas bei slopinti jų dauginimąsi. Ramybės būsenoje paprastai ląstelėse nebūna indukcinės NOS. Ji pradeda sintetinti po kontakto su citokiniais, superantigenais ar kitais stimulatoriais (Won S. J. et al., 2000).

Tirtas įvairių induktorių (IFN $\gamma$ , ConA, PWM, LPS, SEA ir SEB) poveikis NO gamybai galvijų periferinio kraujo monocituose/makrofagocituose. Nustatyta, kad IFN $\gamma$  poveikis NO gamybai buvo greitas ir trumpas (veikė tik iki 3 parų). Ne visi citokinai stimuliuoja azoto oksido sintazę: IFN- $\gamma$  ir TNF- $\alpha$  skatina NO gamybą, o IL-4, IL-10, IL-13, ir TGF- $\beta$  slopina (Cunha F. W. et al., 1992, Vodovotz Y. et al., 1993). Gali būti, kad ir mūsų tyrimo metu IFN $\gamma$  aktyvumą slopino limfocitų gaminami citokinai, todėl jų poveikis NO gamybai monocituose/makrofagocituose buvo trumpas. Kai kurių citokinų poveikis NO gamybai priklauso nuo gyvūno rūšies: IFN- $\alpha/\beta$  žmonių monocituose skatina NO gamybą, o žiurkių makrofagocituose slopina (Adler H. et al., 1995). Kai kurie citokinai vieni indukuoja NO gamybą, kiti – tik kartu su kitais citokiniais. IL-4, IL-10 ir TGF- $\beta$  slopina makrofagocitų citotoksinį aktyvumą ir jų poveikis yra sinergistinis, todėl gali visai nuslopinti NO gamybą. Indukcinė NOS gali būti taip pat reguliuojama šių ląstelių paviršiaus diferenciacijos antigenų – CD23 arba CD8 (Rozendaal R. et al., 1999).

Azoto oksido gamybą panašiai skatino ir abu stafilokokų enterotoksinais (SEA ir SEB). Kuo ilgiau buvo inkubuojama (iki 6 parų), tuo daugiau gaminosi NO. Panašūs rezultatai gauti derinant *Lactobacillus plantarum* metabolizmo produktus su SEA (Stakauskas R., 2001).

Tiriant atskirų mitogenų poveikį NO gamybai monocituose/makrofagocituose, nustatyta, kad aktyviausiai NO gamybą stimuliuavo ConA mitogenas, o kitų mitogenų – PWM ir LPS – įtaka buvo nedidelė. Yra duomenų, jog NO indukcija daug stipresnė, kai LPS veikia kartu su interferonu ar įvairių ligų sukėlėjais, pvz. *Salmonella dublin* (Alam M. S. et al., 2002). Skirtingas mitogenų poveikis NO gamybai, matyt, yra susijęs su tuo, jog atskiri mitogenai stimuliuoja skirtingas ląstelių populiacijas. Žinoma, kad ConA stimuliuoja T limfocitus, PWM aktyvina T ir B limfocitus, o LPS – tik B limfocitus. NO gamyba po 6 parų inkubavimo su didžiausios koncentracijos ConA greičiausiai sumažėjo dėl to, kad didelės ConA dozės tiesiog užmuša ląsteles. NO gamyba glaudžiai siejasi su citokiniais. B limfocitų populiacija gamina labai mažai citokinų, todėl, stimuliuodami ląsteles LPS mitogenu, nenustatėme ženklesnės NO gamybos. Ląstelėse, stimuliuotose PWM mitogenu (T ir B ląstelių stimulatorius), NO aptikta tik po 6 parų inkubavimo. T limfocitai yra gana aktyvūs citokinų gamintojai. Th1 limfocitų subpopuliacija sintetina IL-2 ir IFN- $\gamma$ , o Th2 subpopuliacija – IL-4, IL-5, IL-10 ir IL-13. Tad NO gamyba labai priklauso nuo Th1 ir Th2 ląstelių balanso ir jų funkcinio aktyvumo.

#### Literatūra

1. Adler H., Frech B., Thony M. et al. Inducible nitric oxide in cattle. Differential cytokine regulation of nitric oxide synthase in bovine and murine macrophages. *J. Immunol.* 1995. Vol. 154. P. 4710–4718.
2. Alam M.S., Akaide T., Okamoto et al. Role of nitric oxide in host defence in murine salmonellosis as a factor of its antibacterial and antiapoptosis activities. *Infection and Immunity.* 2002. Vol. 70. P. 3130–42.
3. Bogdan Ch., Rollingshoff M., Diefenbach. Reaktyve oxygen and reactive nitrogen in innate and specific immunity. *Current Opinion in Immunology.* 2000. Vol. 12. P. 64–76.
4. Coleman J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology.* 2001. Vol. 1. P. 1397–1406.

5. Cunha F. W., Moneada S., Liew F. Y. Interleukin-10 inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochem. Res. Commun.* 1992. Vol. 182. P. 1152.
6. Ding A. H., Nathan C. F., Stuehr D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 1988. Vol. 141. P. 2407–2414.
7. Fang F. C. Mechanisms of Nitric Oxide-related Antimicrobial Activity. The American Society for Clinical Investigation. Inc., 1997. Vol. 99. P. 2818–2825.
8. Yui Y., Hattori R., Kosuga K. et al. Calmodin-independent nitric oxide synthase from rat polymorphonuclear neutrophils. *J. Biol. Chem.* 1991. Vol. 166. P. 3369.
9. MacMicking J., Xie Q., Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 1997. Vol. 15. P. 323–350.
10. Mikalauskienė G., Pieškus J. *Imunologijos praktikos darbai*. Vilnius: ACADEMIA, 1999. 156 p.
11. Niedbala W., Wei X., Piedrafita D. et al. Effect of nitric oxide on induction and differentiation of Th1 cells. *Eur. J. Immunol.* 1999. Vol. 29. P. 2498–2505.
12. Remer K. J., Jungi T. W., Fatzer M. G. et al. Nitric Oxide Is Protective in Listeric Meningoencephalitis of Rats. *Infection and Immunity.* 2001. July. P. 4086–4093.
13. Roel C. van der Vee. Nitric oxide and T helper cell immunity. *International Immunopharmacology.* 2001. Vol. 1. P. 1491–1500.
14. Rozendaal R., Vellenga E., Postma D. S. et al. Nitric oxide selectively decreases interferon- $\gamma$  expression by activated human T lymphocytes via a Cgmp-independent mechanism. *Immunology.* 1999. Vol. 98. P. 393–399.
15. Stakauskas R. *Lactobacillus plantarum* ir *Lactobacillus fermentum* metabolizmo produktų įtaka galvijų periferinio kraujo leukocitų funkcijoms *in vitro*. Daktaro disertacija. Kaunas, 2001. 101 p.
16. Stefano G. B., Gouman Y., Bilfinger T. V. Basal nitric oxide limits immune, nervous and cardiovascular excitation: human endothelia express a mu opiate receptor. *Progress in Neurobiology.* 1999. Vol. 60. P. 513–530.
17. Taylor-Robinson A. E., Liew F. Y., Sewern A. et al. Regulation of immune response by nitric oxide synthase from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 11044–11048.
18. Tizard I. *Veterinary immunology. An introduction.* Sixth edition. W. B. Saunder Company, Pennsylvania, 2000. P. 482.
19. Vodovotz Y., Bogdan C., Paik J. et al. Mechanism of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor gamma. *J. Exp. Med.* 1993. Vol. 178. P. 605.
20. Won S.J., Huang W. T., Lai Y. S., Lin M. T. Staphylococcal Enterotoxin A Acts through Nitric Oxide Synthase Mechanisms in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells To Stimulate Synthesis of Pyrogenic Cytokines. *Infection and Immunity.* 2000. Vol. 68. P. 2003–2008.