

Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković" - Beograd¹
Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu - Beograd²

UTICAJ INTERLEUKINA-17 NA PRODUKCIJU AZOT-MONOKSIDA (NO) OD STRANE L929 ČELIJSKE LINIJE MIŠJIH FIBROBLASTA

STANISLAVA STOŠIĆ-GRUJIČIĆ¹, VLADIMIR TRAJKOVIĆ², DANIJELA MAKSIMOVIĆ-IVANIĆ¹ I
TATJANA SAMARDŽIĆ¹

KRATAK SADRŽAJ: Ispitan je uticaj interleukina-17 (IL-17) na produkciju azot-monoksida (NO) od strane L929 fibroblasta. L929 ćelije su inkubirane sa IL-17 i/ili LPS-om, interferonom- γ (IFN- γ), interleukinom-1 (IL-1), ili dibutiril-cAMP-om. Produkcija NO ispitana je indirektno, merenjem koncentracije nitrita akumuliranih nakon 24 h u supernatantu ćelijskih kultura. Kultivisani L929 fibroblasti nisu proizveli NO konstitutivno, niti je sam IL-17 indukovao NO produkciju. Od ostalih ispitanih agenasa samo je IFN- γ značajno povećao nivo nitrita u kulturama L929 ćelija. Međutim, kada je IL-17 primenjen sa bilo kojim od testiranih agenasa, došlo je do snažnog povećanja NO sinteze, što je ukazalo da su signalni putevi indukcije NO sa IL-17 i ostalim navedenim agensima različiti. Sprečavanje akumulacije nitrita inhibitorom proteinske sinteze cikloheksimidom ili selektivnim inhibitorom iNOS aminoguanidinom u ćelijama stimulisanim sa IL-17+LPS ukazalo je da NO produkcija zavisi od sinteze i aktivnosti enzima inducibilne NO sintaze (iNOS). Inhibitor protein tirozin kinaze (PTK), genistein i inhibitor aktivacije transkripcionog faktora NF- κ B, pirolidin ditionkarbamat (PDTC), takođe su redukovali sintezu NO. Nasuprot tome, inhibitor protein kinaze C, staurosporin, nije blokirao NO produkciju L929 ćelija stimulisanih sa IL-17+LPS. U celini, naši rezultati su po prvi put pokazali aktivno učešće IL-17 u koindukciji NO sinteze sa LPS-om, citokinima (IL-1, IFN- γ), ili cAMP analogom u fibroblastima i ukazali da stimulacija NO sinteze sa IL-17 uključuje mehanizme zavisne od PTK i NF- κ B.

Ključne reči: Interleukin-17, azot-monoksid, fibroblasti, citokini

Acta rheum Belgrad 2002; 32 (1):1-10

UVOD

U otkrivanju novih molekula koji učestvuju u funkcionisanju imunskog sistema nedavno je kloniran i okarakterisan citokin interleukin-17 (IL-17) (1-4). Dok je produkcija IL-17 ograničena na T limfocite (1-3), i to CD4⁺ aktivisane memorijske T ćelije (3,5), receptori za IL-17 prisutni su na gotovo svim ćelijama (2), što objašnjava plejotropne aktivnosti ovog citokina. Kao jedan od elemenata složene citokinske mreže IL-17 sam,

ili u sadejstvu sa drugim citokinima, stimuliše produkciju drugih proinflamatornih i hematopoetskih medijatora. Tako, u različitim stromalnim ćelijama, kao što su fibroblasti, sinoviociti, hondroci, keratinociti, endotelne ili epitelne ćelije, IL-17 stimuliše sekreciju G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-6, LIF, IL-8, CXCL1 i CC hemokina, matriks metaloproteinaza, PGE₂ i komponenata kompleksa (3, 6-12). Osim toga, IL-17 povećava ekspresiju intercelularnog adhezionog molekula-1 (ICAM-1) u fibroblastima, sinoviocitima i kera-

tinocitima (3,13). Pored proinflammatory svojstva, IL-17 utiče na resorpciju kostiju (14) i stimulira diferencijaciju osteoklasta (15). Mada je ranije smatrano da IL-17 nema direktnog efekta na ćelije hematopoetskog porekla, skoro je pokazano da on može direktno da utiče na rast i diferencijaciju različitih hematopoetskih progenitora i produkciju proinflammatory medijatora IL-1, IL-1Ra, TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12, mijeloperoksidaza, elastaza i stromelizina od strane zrelih ćelijskih elemenata monocita/makrofaga i neutrofila (10, 16-19). Zbog navedenih svojstava IL-17 ne samo da povezuje imunski sistem i hematopoezu, već predstavlja ranog inicijatora T-zavisnih inflamatornih reakcija.

Biološki aktivan IL-17 detektovan je u sinovijalnoj tečnosti i tkivnim kulturama sinovijuma bolesnika sa reumatoidnim artritismom i osteoartritismom (9, 15, 20, 21). Povećana ekspresija IL-17 nađena je i u regionalnim limfnim čvorovima i sinovijalnoj membrani u adjuvantnom artritisu, široko korišćenom animalnom modelu reumatoidnog artritisa (22). Efekti IL-17 na mnogobrojne ćelijske konstituente zglobova sugeriraju da on ima ključnu ulogu u reumatskim bolestima zglobova. Povećana produkcija IL-17 zapažena je takođe u serumu i limfocitima kože i pluća bolesnika sa sistemskom sklerozom (23).

Nedavno je objavljeno da IL-17 potencira produkciju visoko reaktivnog slobodnog gasovitog radikala azot-monoksida (NO) u hrskavici bolesnika sa osteoartritismom (20), izolovanim osteoartritičnim hondrocitima (24) i normalnim humanim hondrocitima (7). Povećana produkcija NO posredovana aktivnošću inducibilne sintaze azotnog oksida (iNOS) nađena je u različitim reumatskim bolestima, kao što su sistemski eritemski lupus (25), sistemski skleroza (26), primarni Sjörgenov sindrom (27), vaskulitis (28), reumatoidni artritis (29) i osteoartritis (30). U većini ovih poremećaja nivo NO produkcije korelira sa aktivnošću bolesti. Na ulogu NO u patogenezi sistemskih bolesti vezivnog tkiva ukazuju i rezultati povećane ekspresije iNOS u sinovijalnoj membrani obolelih od reumatoidnog artritisa i osteoartritisa (30). Iako u ovim bolestima mononuklearne ćelije periferne krvi i makrofagi ekspimiraju visok nivo iNOS, većina ćelija koje ekspimiraju ovaj enzim su fibroblasti i hondrociti (31, 32).

Produkcija NO u sistemskim bolestima vezivnog tkiva može da doprinese patogenezi samih bolesti na više različitih načina u zavisnosti od

mesta produkcije, količine produkovanog NO i ciljnih ćelija unutar lokalne sredine (revijski prikazano u 33). Male količine NO produkovane od strane krvnog endotela mogu da deluju antiinflammatory tako što regulišu opuštanje glatke muskulature i sprečavaju adheziju leukocita i trombocita za zidove krvnih sudova. Suprotno, visoki nivoi NO, produkovani kao odgovor ćelija na citokine, mogu da učestvuju u oštećenju tkiva i progresiji bolesti, uključujući mehanizam apoptoze tkivnih konstituenata, pokretanje različitih kataboličkih procesa proteolize ekstracelularnog matriksa i onemogućavanje anaboličkih procesa (33-36). I najzad, potencijalni sistemski efekti NO na limfocite i makrofage mogu da imaju imunomodulatornu ulogu (37), tako što NO u malim koncentracijama deluje potencirajuće, a u velikim supresorno.

CILJ RADA

Polazeći od koncepta da fibroblasti predstavljaju aktivne, citokinima regulisane učesnike u patogenezi sistemskih bolesti vezivnog tkiva i važne proizvođače NO, u cilju da se dobije više podataka o biološkim svojstvima i ulozi proinflammatory citokina IL-17 u regulaciji ovih poremećaja, ispitan je uticaj interleukina-17 na NO produkciju fibroblasta u *in vitro* uslovima. Takođe su ispitani signalni putevi kojima IL-17 reguliše aktivnost iNOS, enzima odgovornog za nastanak velikih količina NO.

MATERIJAL I METODE

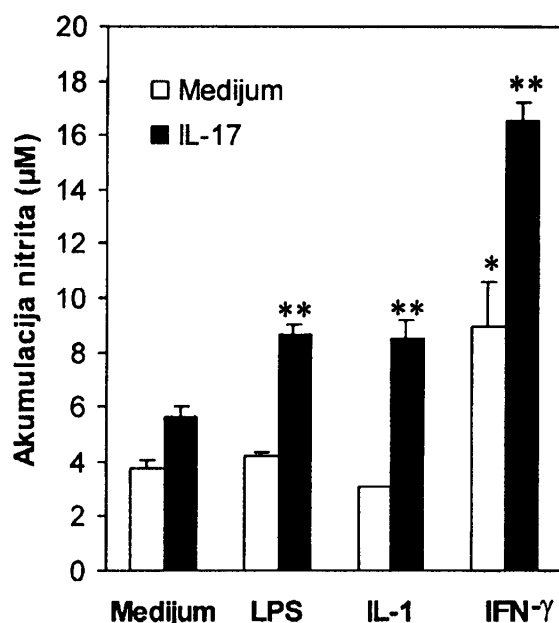
Ćelijska linija mišjeg fibrosarkoma L929 (European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, UK) gajena je do konfluentnosti na 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂ u medijumu za kultivaciju RPMI-1640 dopunjenim sa 10% fetalnog telećeg seruma, 2mM L-glutamina, antibioticima i Na-piruvatom. Posle konvencionalnog postupka tripsinske digestije, ćelije su kultivisane u plastičnim pločama za mikrokulturu sa 96 bazenčića (Linbro, Flow) u zapremini od 200 μ l medijuma za kulturu. Po dostizanju konfluentnosti sloj adherentnih ćelija je opran i dodata je ista zapremina svežeg medijuma koji je sadržao 20 ng/ml rekombinantnog humanog IL-17 (R&D Systems, Minneapolis, MN), samog ili u kombinaciji sa 10 μ g/ml LPS (LPS E. coli 055:B5, Difco, Detroit, MI), 200 J/ml rekombinantnog mišjeg interferona- γ (IFN- γ , Holland Biotechnology, Leiden, The Netherlands), 10 ng/ml rekombinan-

tnog humanog interleukina-1 α (Genzyme, Cambridge, MA), ili 200 μ M ćelijski propustljivog stabilnog c-AMP analoga, db-cAMP (Sigma, St Louis, MO). U cilju karakterizacije produkcije NO stimulisane sa IL-17 + LPS korišćeni su sledeći reagensi: inhibitor proteinske sinteze cikloheksimid (CHX, 5 μ g/ml), selektivni iNOS inhibitor aminoguanidin (AG, 1 mM), inhibitor NF- κ B pirolidin ditiokarbamat (PDTC, 10 μ M), inhibitor protein tirozin kinaze genistein (GEN, 5 μ g/ml) (svi proizvodi Sigma), ili inhibitor protein kinaze C staurosporin (STSN, 25 nM) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Sve kulture su postavljane u triplikatima. Ćelije su inkubirane 24 h u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂, nakon čega su sakupljani supernatanti ćelijskih kultura za određivanje produkcije NO. Akumulacija nitrita, kao indikator NO produkcije, merena je u supernatantima kultura metodom po Griess-u (38). Ukratko, uzorci supernatanta od 50 μ l mešani su sa istom zapreminom Griess-ovog reagensa (1:1 mešavina 0,1% naftilendiamin dihidrohlorida i 1% sulfanilamida u 5% H₃PO₄) (Sigma) i inkubirani su 10 min. na sobnoj temperaturi. Apsorbancija je određivana na talasnoj dužini od 570 nm na automatskom ELISA čitaču (Titertek® Multiscan, Flow Labs). Koncentracija nitrita (μ M) izračunavana je na osnovu standardne krive NaNO₂. Preživljavanje ćelija

određivano je u vreme merenja nitrita kolorimetrijskim testom kristal violetom (39), u kome je intenzitet boje, meren na talasnoj dužini od 570 nm na automatskom ELISA čitaču, proporcionalan broju vijabilnih ćelija.

REZULTATI

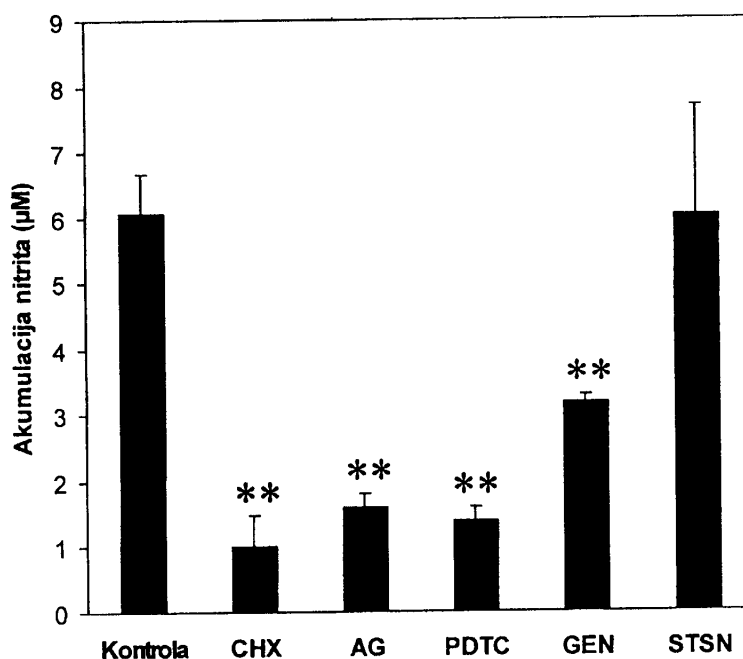
U cilju ispitivanja produkcije NO u L929 fibroblastima korišćeni su LPS i citokini IFN- γ i IL-1, agensi za koje je pokazano da sami, ili u kombinacijama, mogu da indukuju u ovim ćelijama sintezu NO. Saglasno našim prethodnim rezultatima (40, 41), od svih testiranih stimulusa upotrebljenih pojedinačno samo je IFN- γ (200 J/ml) značajno stimulisao produkciju NO, sudeći po skoro trostrukom porastu akumulacije nitrita u supernatantu stimulisanih L929 fibroblasta u poređenju sa veoma niskim bazalnim nivoom nitrita u supernatantima nestimulisanih ćelija (slika 1). Dok je IL-17 (20 ng/ml) izazvao blago, mada nesignifikantno povećanje koncentracije nitrita, dotle ni sam LPS (10 μ g/ml), ni IL-1 (10 ng/ml) nisu značajnije uticali na NO produkciju L929 fibroblasta, (Slika 1). Međutim, kada je IL-17 primenjen zajedno sa LPS, ili IL-1, došlo je do značajnog skoka sinteze NO, a u sadejstvu IL-17 sa IFN- γ čak je zapažen sinergistički efekat (slika 1).



Slika 1. Efekat IL-17 na NO produkciju L929 fibroblasta. Konfluentne L929 ćelije su inkubirane sa IFN- γ (200 J/ml), LPS (10 μ g/ml), IL-1 (10 ng/ml), ili samo u medijumu, u prisustvu ili odsustvu IL-17 (20 ng/ml). Koncentracija nitrita u supernatantu ćelijskih kultura merena je nakon 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost + SG tri pojedinačna eksperimenta. * $P < 0,05$ i ** $P < 0,01$ (Studentov t test) u odnosu na netretirane ćelije.

U cilju da se ispita potreba za enzimskom aktivnošću iNOS u produkciji NO indukovanoj u L929 ćelijama stimulacijom sa IL-17 u sadejstvu sa navedenim stimulatorima, ispitano je dejstvo inhibitora translacije, cikloheksimida (5 $\mu\text{g/ml}$) i aminoguanidina (1 mM), selektivnog inhibitora katalitičke aktivnosti iNOS (42). Pošto je akumulacija nitrita u ćelijskim supernatantima ćelija stimuliranih sa IL-17+LPS bila skoro u potpunosti inhibirana ovim agensima (Slika 2), to ukazuje da je zapažena NO produkcija zavisna od *de novo* sinteze inducibilne NO sintaze i oksidacije L-arginina ovim enzimom. Polazeći od toga da transkripcija iNOS gena zavisi od aktivacije transkripcionog faktora NF- κ B, u cilju karakterizacije intracelularnih događaja koji su odgovorni za regulaciju aktivacije iNOS u fibroblastima sa

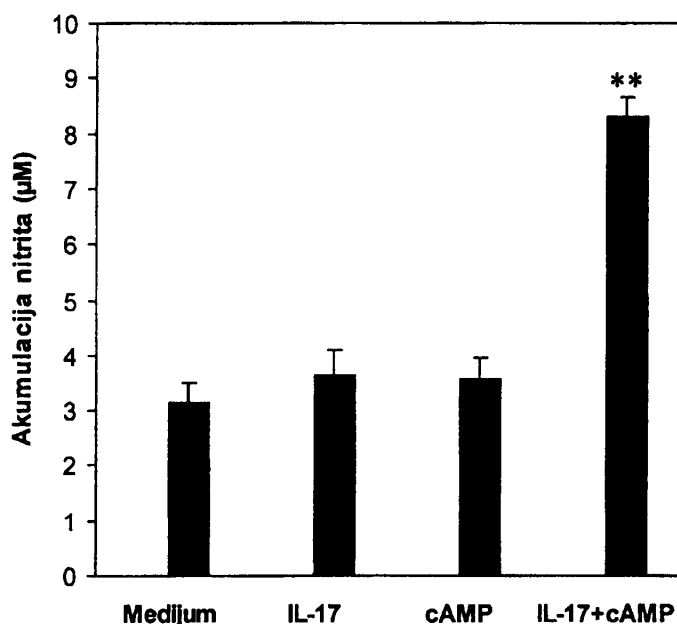
IL-17, u istom sistemu stimulacije L929 ćelija sa IL-17+LPS ispitani su efekti PDTC (10 μM), moćnog inhibitora NF- κ B (43). I ovaj agens značajno je inhibirao NO produkciju (slika 2), što sugeriše da je NF- κ B uključen u signalni put IL-17 u ovim ćelijama. Želeći da ispitamo ulogu protein tirozin kinaze (PTK) i protein kinaze C (PKC) u signalnim putevima aktivacije iNOS pomoću IL-17, primenili smo njihove inhibitore GEN (5 $\mu\text{g/ml}$) i STNS (25 nM). Dok je produkcija NO bila redukovana u prisustvu GEN kao posledica interferencije ovog agensa sa PTK-zavisnim intracelularnim događajima, dotle STNS nije ispoljio inhibitorno dejstvo na sintezu NO u IL-17+LPS-tretiranim ćelijama (slika 2), što govori da indukcija sinteze NO u ovom sistemu ne zavisi od PKC aktivnosti.



Slika 2. Efekat inhibitora proteinske sinteze, iNOS, NF- κ B i kinaza na NO produkciju L929 fibroblasta stimuliranih dejstvom IL-17 + LPS. Konfluentne L929 ćelije su stimulirane sa IL-17 + LPS samostalno (kontrola), ili u prisustvu inhibitora proteinske sinteze CHX (5 $\mu\text{g/ml}$), iNOS inhibitora AG (1 mM), NF- κ B inhibitora PDTC (10 μM), PTK inhibitora GEN (5 $\mu\text{g/ml}$), ili PKC inhibitora STSN (25 nM). Koncentracija nitrita u supernatantu ćelijskih kultura merena je nakon 24 h. Rezultati reprezentativnog eksperimenta su prikazani kao srednja vrednost + SG triplikata. ** $P < 0,01$ (Student-ov t test) u odnosu na kontrolne kulture.

Mi smo nedavno pokazali da db-cAMP, ćelijski permeabilni cAMP analog i aktivator protein kinaze A, potencira iNOS-zavisnu produkciju NO u L929 fibroblastima u sadejstvu sa IFN- γ (40, 41). Da bi se ispitalo da li IL-17 na sličan način utiče na NO produkciju, L929 ćelije su kultivisane u prisustvu db-cAMP (200 μM) i/ili IL-17. Merenje koncentracije nitrita pokazalo

je da pojedinačno dejstvo db-cAMP, slično IL-17, ne dovodi do stimulacije NO produkcije, ali da je simultano dejstvo oba agensa značajno povećava (slika 3). Ovi rezultati govore u prilog koordinisanog dejstva signalnog puta aktivacije PKA i signala pokrenutih dejstvom IL-17 u aktivaciji NO produkcije L929 fibroblasta.



Slika 3. Efekat db-cAMP na NO produkciju L929 fibroblasta tretiranih sa IL-17. Konfluentne L929 ćelije su inkubirane samo u medijumu, a u prisustvu ili odsustvu db-cAMP (200 µM). Koncentracija nitrita u supernatantu ćelijskih kultura merena je nakon 24 h. Rezultati reprezentativnog eksperimenta su prikazani kao srednja vrednost + SG triplikata. ** $P < 0,01$ (Student-ov t test) u odnosu na netretirane ćelije.

DISKUSIJA

U ovom radu je pokazana sposobnost IL-17 da potencira biosintezu NO od strane fibroblasta mišije ćelijske linije L929. Ovaj efekat IL-17 ostvaruje u sadejstvu sa LPS, citokinima (IFN- γ , IL-1), ili cAMP- analogom, db-cAMP. Stimulacija NO sinteze u L929 fibroblastima LPS-om ili citokinima u skladu je sa sličnim rezultatima dobijenim na primarnim fibroblastima glodara (44). Koliko nam je poznato, međutim, ovo je prvi rad koji opisuje sinergističku kooperaciju između IL-17 i različitih NO-indukujućih agenasa u aktivaciji NO sinteze fibroblasta. Ovi rezultati su u saglasnosti sa skorašnjim nalazima dobijenim kod bolesnika sa osteoartritisom, koji pokazuju da bazalna NO produkcija u hrskavici ili izolovanim hondrocitima može biti potencirana dodavanjem IL-17 (20, 24). Međutim, mi smo nedavno pokazali da IL-17 ispoljava ćelijsku specifičnost, delujući stimulatorno na NO produkciju aktivisanih astrocita glodara, ali ne i aktivisanih makrofaga (45). U našem radu efekti IL-17 na NO produkciju postignuti su pri koncentraciji rekombinantnog citokina koja je približna koncentracijama potrebnim za druge biološke aktivnosti IL-17 (3, 7, 20) što sugeriše da opisani efekti mogu imati fiziološki značaj.

Potencirajuće dejstvo IL-17 na NO produkciju, kako je ovde izneto, osetljivo je na delovanje inhibitora translacije CHX i selektivnog iNOS inhibitora AG, što ukazuje da je ono posredovano aktivacijom inducibilne izoforme NOS, enzima, odgovornog za dugotrajnu produkciju velikih količina NO. Ekspresija iNOS stimulirana je mnogobrojnim citokinima i produktima mikroorganizama, koji često deluju sinergistički (46). Na mišijim makrofagima je pokazano da je za optimalnu transkripciju ovog enzima neophodno vezivanje transkripcionog faktora NF- κ B za odgovarajuću sekvencu u promotoru za iNOS (47), kao i da je inhibicija NO sinteze u različitim tipovima ćelija često povezana sa smanjenim vezivanjem NF- κ B za DNK (48). U hroničnim inflamatornim bolestima, kao što je RA, NF- κ B je aktivisan u sinovijalnom tkivu i učestvuje u regulaciji brojnih proinflamatornih gena, kao što su proinflamatorni citokini i hemokini, adhezivni molekuli, matriks metaloproteinaze, COX-2 i iNOS (49). S druge strane, kao i nekoliko drugih proinflamatornih citokina, IL-17 aktivira NF- κ B (2). U skladu sa tim, mi smo pokazali da i u L929 fibroblastima NO produkcija uplivisana IL-17 citokinom zahteva funkcionalnu aktivaciju NF- κ B, pošto je stimulacija NO sa IL-17+LPS bila je blokirana sa PDTC, antioksidativnim agensom i NF- κ B inhibitorom (43). Ovaj nalaz je u skladu sa

podacima da je IL-17-indukovana NO produkcija u hrskavici obolelih od osteoartritisa takođe osetljiva na dejstvo PDTC (20, 24). Pošto je i LPS poznat kao aktivator NF- κ B (50), čije je dejstvo takođe podložno inhibiciji sa PDTC (51), razumljivo je da se supresija NO sinteze u L929 fibroblastima tretiranim sa IL-17+LPS ne može pripisati samo inhibiciji NF- κ B aktivisanog dejstvom IL-17, već sadejstvom oba aktivatora.

Regulacija aktivacije NF- κ B (46), a time i transkripcije iNOS (revijski prikazano u 52), uključuje više puteva prenosa signala u kojima učestvuju tirozin kinaze, MAP kinaze aktivisane serin-treonin kinazama (PKA, PKC), protein-fosfataza i serin proteaza. Zavisnost ekspresije iNOS od pojedinačnih signalnih puteva uslovljena je vrstom stimulusa i razlikuje se u različitim tipovima ćelija (46, 52). Tako je pokazano da proces indukcije iNOS, izazvan u makrofagima LPS-om ili IFN- γ , zavisi od aktivnosti PTK i da se može blokirati PTK inhibitorom GEN (53). Ovo govori u prilog da u pojedinim tipovima ćelija u aktivaciji NF- κ B, kao i u indukciji iNOS fosforilacija proteina posredovana tirozin kinazama ima važnu ulogu (54). Mada u literaturi za fibroblaste nema sličnih podataka, mi smo pokazali da se i u L929 fibroblastima stimulisanim bilo IFN- γ (55), ili IL-17+LPS (u ovom radu) odvija proces inhibicije NO produkcije pomoću GEN, što govori o zavisnosti indukcije iNOS od PTK u ovim ćelijama. Ipak, neophodna su dalja istraživanja da bi se bolje ispitalo učešće IL-17 u indukciji i PTK i NF- κ B aktivnosti tokom sinergističke aktivacije NO sinteze fibroblasta u sadejstvu sa LPS-om ili citokinima.

Mada se pretpostavlja da u iNOS aktivaciji učestvuje PKC (24), pokazano je da u zavisnosti od vrste stimulusa aktivnost PKC nije uvek neophodna za optimalnu indukciju NO sinteze, bar kada su u pitanju humani hondrociti (54). Naši rezultati dobijeni sa PKC inhibitorom STSN, agensom koji suprimira oslobađanje NO u mišjim makrofagima na način zavisian od PKC (56), ukazuju da PKC nije ključan faktor u IL-17+LPS-indukovanoj NO produkciji L929 fibroblasta. Međutim, tumačenje ovih rezultata komplikuje mogućnost da se PKC-zavisian inhibicioni efekat STSN na iNOS aktivaciju u L929 ćelijama može prevazići PKC-nezavisnim stimulatornim efektom na formiranje NO, opisanim nedavno u ćelijama glatke muskulature (57).

Adenozin i njegov prirodni derivat cAMP važni su faktori ćelijske signalizacije. Uloga

cAMP-zavisne aktivacije PKA kaskade u ekspresiji iNOS gena opisana je u različitim ćelijama, kao npr. u ćelijama glatke muskulature, bubrežnim mezangijalnim ćelijama, makrofagima, astrocitima ili fibroblastima 3T3 linije (58-62). U skladu s tim, mi smo nedavno opisali potencirajući efekat cAMP na NO produkciju L929 fibroblasta stimulisanu IFN- γ (41). U ovom radu smo pokazali da NO sinteza može da se poveća kombinovanim dejstvom IL-17 i membranski propustljivog stabilnog derivata cAMP, db-cAMP, što još jednom potvrđuje ulogu metabolizma cAMP u aktivaciji iNOS u fibroblastima i ukazuje na moguću povezanost dejstava akumulacije cAMP i IL-17. Imajući u vidu da i IL-17 i cAMP učestvuju u indukciji aktivacije NF- κ B (2, 62), može se pretpostaviti da je susticanje signalnog puta PKA pokrenutog c-AMP-om i signala posredovanih citokinom IL-17 odgovorno za sinergističko dejstvo ovih agenasa u indukciji NO produkcije L929 fibroblasta. Ovaj naš nalaz je, međutim, u suprotnosti sa nedavno opisanim inhibicionim dejstvom 8-Br-cAMP na NO produkciju humanih osteoartritičnih hondrocita stimulisanih sa IL-17 (24). Suprotni efekti dobijeni u dva različita ćelijska sistema mogu se objasniti različitošću procesa uključenih u produkciju NO, i/ili različitim značajem pojedinih od tih procesa u različitim tipovima ćelija. U prilog tome govori pomenuta ćelijska specifičnost dejstva IL-17 u indukciji iNOS (45). Takođe postoje brojni primeri da i sam cAMP može biti dvojni modulator biosinteze NO indukovane određenim imunskim stimulusima, što je uslovljeno ćelijskom specifičnošću, kao i uzajamnom regulacijom između citokina, cAMP i NO (revijski prikazano u 63).

Fibroblasti predstavljaju aktivne učesnike sistemskih bolesti vezivnog tkiva, kao što su sistemska skleroza, pulmonarna fibroza ili reumatoidni artritis (64, 65). Oni su moćni producenti NO (44) i kao takvi mogu doprineti patogenezi bolesti na različite načine. Tako, hronično oslobađanje NO iz fibroblasta može da predstavlja regulatorni signal za sintezu kolagena i sledstvenu fibrozu, ili da ispolji brojne kataboličke efekte na hondrocite vodeći degradaciji hrskavice (33). Stoga naši rezultati dobijeni na fibroblastima mišije ćelijske linije L929 ukazuju da bi regulacija NO produkcije fibroblasta mogla predstavljati još jedan mogući aspekt uloge IL-17 kao ranog inicijatora bolesti i kao faktora progresije navedenih patoloških stanja. Međutim, imajući u vidu da fibroblasti pokazuju fenotipsku raznolikost, što

ukazuje i na postojanje eventualne funkcionalne raznolikosti (66), neophodna su dalja istraživanja na primarnim fibroblastima, a posebno na humanim fibroblastima određenih anatomskih regiona.

ZAKLJUČAK

Rezultati ovog rada pokazuju da T ćelijski citokin IL-17 igra značajnu ulogu u aktivaciji NO sinteze fibroblasta. Stimulacija NO produkcije pomoću IL-17 uključuje kompleksnu aktivaciju

PTK i NF- κ B. Sinergistička indukcija biosinteze NO izazvana dejstvom IL-17 u kombinaciji sa LPS-om, citokinima (IFN- γ , IL-1), ili db-cAMP-om sugerše da su signalni putevi IL-17 i ovih NO-indukujućih agenasa, koji se sustiču u aktivaciji iNOS, različiti i komplementarni. Imajući u vidu dobro poznatu ulogu NO u fibrozi i inflamaciji, naši rezultati ukazuju na još jedan aspekt mogućeg dejstva IL-17 u sistemskim bolestima vezivnog tkiva.

LITERATURA

1. Rouvier E, Luciani MF, Mattei MG et al. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a *Herpesvirus saimiri* gene. *J Immunol* 1993;150: 5445-5456.
2. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF et al. *Herpesvirus saimiri* encodes a new cytokine IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 1995;3: 811-821.
3. Fossiez F, Dossou O, Chomarat P et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hemopoietic cytokines. *J Exp Med* 1996;183: 2593-2603.
4. Kennedy J, Rossi DL, Zurawski SM et al. Mouse IL-17: a cytokine preferentially expressed by alpha beta TCR+ CD4CD8- T cells. *J Interferon Cytokine Res* 1996;16: 611-617.
5. Aarvak T, Chabaud M, Miossec P, Natvig JB. IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells, but not by Th2 cells. *J Immunol* 1999;162: 1246-1251.
6. Yamamura Y, Gupta R, Morita Y et al. Effector function of resting T cells: activation of synovial fibroblasts. *J Immunol* 2001;166: 2270-2275.
7. Shalom-Barak T, Quach J, Lotz M. Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF- κ B. *J Biol Chem* 1998;273: 27467-27473.
8. Van Kooten C, Boonstra JG, Paape ME et al. Interleukin-17 activates human renal epithelial cells *in vitro* and is expressed during renal allograft rejection. *J Am Soc Nefrol* 1998;9: 1526-1534.
9. Chabaud M, Fossiez F, Taupin J-L. Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J Immunol* 1998;161: 409-414.
10. Katz Y, Nadiv O, Beer Y. Interleukin-17 enhances tumor necrosis factor alpha-induced synthesis of interleukins 1, 6 and 8 in skin and synovial fibroblasts: a possible role as a "fine-tuning cytokine" in inflammation processes. *Arthritis Rheum* 2001;44: 2176-2184.
11. Laan M, Cui ZH, Hoshino H et al. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol* 1999;162: 2347-2352.
12. Katz Y, Nadiv O, Rapoport MJ, Loss M. IL-17 regulates gene expression and protein synthesis of the complement system, C3 and factor B, in skin fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 2000;120: 22-29.
13. Teunissen MBM, Koomen CW, de Waal Malefyt R et al. Interleukin-17 and interferon- γ synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1998;111: 645-649.
14. van Bezooijen RL, Farih-Sips HCM, Papapoulos SE, Lowik CWGM. Interleukin-17: a new bone acting cytokine *in vitro*. *J Bone Miner Res* 1999;14: 1513-1521.
15. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 1999;103: 1345-1352.
16. Schwarzenberg P, La Russa V, Miller A et al. IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for *in vivo* evaluation of cytokines. *J Immunol* 1998;161: 6383-6389.
17. Jovčić G, Bugarski D, Petakov M et al. Effect of IL-17 on *in vitro* hematopoietic progenitor cells growth and cytokine release in normal and post-irradiated murine bone marrow. *Growth Factors* 2001;19: 61-71
18. Jovanović DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-1 β , TNF- α , by human macrophages. *J Immunol* 1998;160: 3513-3521.

19. Hoshino H, Laan M, Sjostrand M et al. Increased elastase and myeloperoxidase activity associated with neutrophil recruitment by IL-17 in airways *in vivo*. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105: 143-149.
20. Attur MG, Patel RN, Abramson SB, Amin AR. Interleukin-17 up-regulation of nitric oxide production in human osteoarthritis cartilage. *Arthritis Rheum* 1997;40: 1050-1053.
21. Chabaud M, Durand JM, Buchs N et al. Human IL-17: a T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1999;42: 963-970.
22. Bush KA, Walker JS, Lee CS, Kirkham BW. Cytokine expression and synovial pathology in the initiation and spontaneous resolution phases of adjuvant arthritis: interleukin-17 expression is upregulated in early disease. *Clin Exp Immunol* 2001;123: 487-495.
23. Kurasawa K, Hirose K, Sano H et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2455-2463.
24. Martel-Pelletier J, Mineau F, Jovanovic D et al. Mitogen-activated protein kinase and nuclear factor κ B together regulate interleukin-17-induced nitric oxide production in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1999;42: 2399-2409.
25. Clancy RM, Abramson SB. Nitric oxide: a novel mediator of inflammation. *Soc Exp Biol Med* 1995;210: 93-101.
26. Yamamoto T, Sawada Y, Katayama I, Nishioka K. Increased production of nitric oxide stimulated by interleukin-1 β in peripheral blood mononuclear cells in patients with systemic sclerosis. *Brit J Rheum* 1998;37: 1123-1125.
27. Kontinen YT, Platts LAM, Tuominen S et al. Role of nitric oxide in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1997;40: 875-883.
28. Weyand CM, Wagner AD, Bjornsson J, Goronzy JJ. Correlation of the topographical arrangement and the functional pattern of tissue-infiltrating macrophages in giant cell arteritis. *J Clin Invest* 1996;98: 1642-1649.
29. Farrell AJ, Blake D, Palmer RMJ, Moncada S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 1992; 51:1219-1222.
30. Amin AR, di Cesare PE, Vyas P et al. The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1995;182: 2097-2102.
31. Sakurai H, Kohsaka H, Liu MF et al. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J Clin Invest* 1995;96: 2357-2363.
32. McInnes IB, Leung BP, Field M et al. Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J Exp Med* 1996;184: 1519-1524.
33. Clancy RM, Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum* 1998;41: 1141-1151.
34. Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 1995;146: 75-85.
35. Murel GA, Jang D, Williams RJ. Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;206: 15-21.
36. Taskiran D, Stefanovic-Racic M, Georgescu H, Evans C. Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;200: 142-148.
37. Merryman PF, Clancy RM, He XY, Abramson SB. Modulation of human T cell response by nitric oxide and its derivative, S-nitrosoglutathione. *Arthritis Rheum* 1993;36: 1414-1422.
38. Hibbs JB, Taintor R, Vavrin Z, Rachlin E. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;157: 87-94
39. Takahashi GW, Montgomery RB, Stahl WL et al. Pentoxifylline inhibits tumor necrosis factor- α -mediated cytotoxicity and cytostasis in L929 murine fibrosarcoma cells. *Int J Immunopharmac* 1994;16: 723-736.
40. Stošić-Grujičić S, Trajković V, Badovinac V, Mostarica Stojković M. Pentoxifylline potentiates nitric oxide production and growth suppression in interferon- γ -treated L929 fibroblasts. *Cell Immunol* 1998;183: 105-111.
41. Samardžić T, Stošić-Grujičić S, Maksimović D et al. Differential regulation of nitric oxide production by increase of intracellular cAMP in murine primary fibroblasts and L929 fibrosarcoma cell line. *Immunol Lett* 2000;71: 149-155.
42. Misko TP, Moore WM, Kasten TP et al. Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur J Pharmacol* 1993;233: 119-125.
43. Schreck R, Meier B, Mannel DN et al. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J Exp Med* 1992;175: 1181-1194.
44. Lavnikova N, Laskin DL. Unique pattern of regulation of nitric oxide production in fibroblasts. *J Leucocyte Biol* 1995;58: 451-458.

45. Trajković V, Stošić-Grujičić S, Samardžić T et al. Interleukin-17 stimulates inducible nitric oxide synthase activation in rodent astrocytes. *J Neuroimmunol* 2001;119: 183-191.
46. MacMicking J, Xie Q-w, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:323-350.
47. Saura M, Zaragoza C, Bao C et al. Interaction of interferon regulatory factor-1 and nuclear factor κ B during activation of inducible nitric oxide synthase transcription. *J Mol Biol* 1999;289: 459-471.
48. Rao KM. Molecular mechanisms regulating iNOS expression in various cell types. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2000;3: 27-58.
49. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B - a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997;336: 1066-1071.
50. Baldwin AS, Jr. The NF- κ B and I- κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14: 649-681.
51. Beak S-H, Kwon TK, Lim J-H et al. Secretory phospholipase A₂-potentiated inducible nitric oxide synthase expression by macrophages requires NF- κ B activation. *J Immunol* 2000;164: 6359-6365.
52. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunol* 2001;2: 907-916.
53. Dong Z, Qi X, Xie K, Fidler IJ. Protein tyrosine kinase decrease induction of nitric oxide synthase activity in lipopolysaccharide-responsive and lipopolysaccharide-nonresponsive murine macrophages. *J Immunol* 1993;151: 2717-2724.
54. Geng Y, Maier R, Lotz M. Tyrosine kinases are involved with the expression of inducible nitric oxide synthase in human articular chondrocytes. *J Cell Physiol* 1995;163: 545-554.
55. Janković V, Samardžić T, Stošić-Grujičić S et al. Cell-specific inhibition of inducible nitric oxide synthase activation by leflunomide. *Cell Immunol* 2000;199: 73-80.
56. Jun CD, Choi BM, Kim HM, Chung HT. Involvement of protein kinase C during taxol-induced activation of murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 1995;154: 6541-6547.
57. Hecker M, Preiss C, Schinikerth VB. Induction by staurosporine of nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells: role of NF- κ B, CREB and C/EBP β . *Brit J Pharmacol* 1997;120: 1067-1074.
58. Koide M, Kawahara Y, Nakayama I et al. Cyclic AMP-elevating agents induce an inducible type of nitric oxide synthase in cultured vascular smooth muscle cells: synergism with the induction elicited by inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 1993;268: 24959-24966.
59. Kunz D, Muhl H, Walker G, Pfeilschifter J. Two distinct signaling pathways trigger the expression of inducible nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91: 5387-5391.
60. Greten TF, Eigler A, Sinha B et al. The specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram differentially regulates the proinflammatory mediators TNF- α and nitric oxide. *Int J Immunopharmacol* 1995;17: 605-610.
61. Pahan K, Namboodiri AM, Sheikh FG et al. Increasing cAMP attenuates induction of inducible nitric oxide synthase in rat primary astrocytes. *J Biol Chem* 1997;272: 7786-7791.
62. Kleinert H, Euchenhofer C, Ihrigbiedert I, Forsterman U. In murine 3T3 fibroblasts, different second messenger pathways resulting in the induction of NO synthase II (iNOS) converge in the activation of transcription factor NF- κ B. *J Biol Chem* 1996;271: 6039-6044.
63. Zidek Z. Role of cytokines in the modulation of nitric oxide production by cyclic AMP. *Eur. Cytokine Netw* 2001;12: 22-32.
64. LeRoy EC. A brief overview of the pathogenesis of scleroderma (systemic sclerosis) *Ann Rheum Dis* 1992;51: 286-288.
65. Haris ED Jr. Rheumatoid arthritis pathophysiology and implications for treatment. *N Eng J Med* 1990;322: 1277-1289.
66. Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP. Fibroblasts as sentinel cells: synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *American J Pathol* 1997;151:317-322.

S U M M A R Y

*Institute for Biological Research "Siniša Stanković"- Belgrade¹
Institute of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Belgrade University - Belgrade²*

EFFECT OF INTERLEUKIN-17 ON NITRIC OXIDE PRODUCTION IN MURINE FIBROBLAST-LIKE CELL LINE L929

STANISLAVA STOŠIĆ-GRUJIČIĆ¹, VLADIMIR TRAJKOVIĆ², DANIJELA MAKSIMOVIĆ-IVANIĆ¹
TATJANA SAMARDŽIĆ¹

The ability of interleukin-17 (IL-17) to induce nitric oxide (NO) synthesis in murine L929 fibroblasts was investigated. L929 cells were incubated with IL-17 and/or LPS, interferon- γ (IFN- γ), interleukin-1 (IL-1), or dibutyryl-cAMP. NO production was assessed indirectly, by measuring nitrite accumulation in 24 h culture supernatants. L929 fibroblasts did not produce NO constitutively, nor IL-17 alone induced NO production. Of all other stimuli tested, only IFN- γ significantly upregulated nitrite level in L929 cell cultures. However, when IL-17 was applied simultaneously with each of the tested stimuli, NO synthesis was markedly elevated, thus indicating involvement of distinct signaling pathways of NO induction by IL-17 and other tested agents. Production of NO by IL-17+LPS-treated L929 cells was dependent on synthesis and activity of inducible NO synthase (iNOS), as indicated by abrogation of nitrite accumulation with protein synthesis inhibitor cycloheximide or selective inhibitor of iNOS, aminoguanidine. A role for protein tyrosine kinase (PTK) and transcription factor NF- κ B in iNOS activation is suggested by reduction of NO synthesis with PTK inhibitor genistein and an inhibitor of NF- κ B activation, pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC). In contrast, protein kinase C inhibitor staurosporine was ineffective in blocking IL-17+LPS-induced NO production in L929 cells. Taken together, our results for the first time showed an active participation of IL-17 in co-induction of fibroblast NO synthesis with LPS, cytokines (IL-1, IFN- γ), or cAMP analogue, and suggested that IL-17 up-regulated NO synthesis in fibroblasts through mechanisms involving PTK and NF- κ B activation.

Key words: *Interleukin-17, nitric oxide, fibroblasts, cytokines*