



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Parasetamolin vaikutus myeloperoksideasin toimintaan

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän Yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solu- ja molekyylibiologia

Tammikuu 2013

Joanna Lempiäinen

ALKUSANAT

Tämän pro gradu- tutkielman laboratoriotyöt tehtiin Turun yliopiston Biokemian laitoksella immunokemian tutkimusryhmässä kesällä 2012.

Haluan kiittää ohjaajiani Janne Atosuota ja Esa-Matti Liliusta asiantuntevasta opastuksesta sekä motivoivasta työympäristöstä. Lisäksi haluan kiittää Jari Nuutilaa vinkeistä Originin käytössä sekä koko tutkimusryhmää rennosta ja luottavaisesta ilmapiiristä. Haluan myös kiittää Jyväskylän yliopiston professori Jari Ylännettä kirjoittamiseen liittyvistä vinkeistä.

Lopuksi haluan kiittää perhettäni ja ystäviäni tuesta ja kannustuksesta, joita ilman en olisi ikinä saanut työtä näin vauhdilla valmiiksi.

Jyväskylässä, tammikuu 2013

Joanna Lempiäinen

Tekijä:	Joanna Lempiäinen
Tutkielman nimi:	Parasetamolin vaikutus myeloperoksidaasin toimintaan
English title:	The effects of paracetamol on myeloperoxidase function
Päivämäärä:	20.1.2013 Sivumäärä: 44 + 1
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Oppiaine:	Solu- ja molekyylibiologia
Tutkielman ohjaajat:	Esa-Matti Lilius (Dos.) ja Janne Atosuo (FM) Turun yliopisto Valvoja Jari Yläne (Prof.) Jyväskylän yliopisto

Tiivistelmä:

Myeloperoksidaasi on neutrofiilien ja monosyyttien entsyymi, joka muuttaa vetyperoksidia bakterisidiseksi yhdisteiksi, kuten hypokloorihapokkeeksi. Myeloperoksidaasia on pidetty neutrofiilien bakterisidiselle toiminnalle elintärkeänä, sillä sen on ajateltu tehostavan neutrofiilien bakteeritappoa merkittävästi. Viimeaikoina on kuitenkin saatu tutkimustuloksia, joiden mukaan veressä vapaana oleva myeloperoksidaasi voisi toimia sairauden aiheuttajana pahentaen muun muassa ateroskleroosin ja nivelreuman oireita. Myeloperoksidaasin tuottamaa hypokloorihapokkeen määrää voidaan mitata epäsuorasti luminolivahvisteisella kemiluminesenssilla. Eristetyn myeloperoksidaasin ja neutrofiilien kykyä tappaa bakteereja on mahdollista tutkia myös suoraan käyttämällä bioluminesoivaa *Escherichia coli* bakteeria (*E. coli* -lux), joka sisältää *Photobacterium luminescens* bakteerin lusiferaasigeenin. Reaktiosta emittoituva valo on tällöin suoraan verrannollinen reaktiossa olevien *E. coli* -lux bakteerien määrään. Suosittu kipulääke, parasetamoli, inhiboi myeloperoksidaasin hypokloorihapokkeen tuottoa ja sen on havaittu inhiboivan myös myeloperoksidaasin kemiluminesenssia. Parasetamolin vaikutuksia myeloperoksidaasin bakteeritappoon ei kuitenkaan ole aiemmin tutkittu, eikä parasetamolin vaikutuksia myeloperoksidaasiin ole aiemmin tutkittu mittaamalla kemiluminesenssia yhtäjaksoisesti.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, miten parasetamoli vaikuttaa myeloperoksidaasin kemiluminesenssiin ja bakteeritappoon. Kokeet tehtiin happamassa ja neutraalissa pH:ssa, sillä myeloperoksidaasia on neutrofiilien happamien fagolysosomien lisäksi solun ulkopuolella.

Kaikki mittaukset tehtiin luminometrilla. Myeloperoksidaasin tuottamaa hypokloorihapokkeen määrää mitattiin luminolivahvisteisena kemiluminesenssina eri parasetamolipitoisuuksilla. Bakteeritapon reaktioissa tarkkailtiin myeloperoksidaasin tappamien *E. coli* -lux bakteerien määrää mittaamalla reaktiosta emittoituvaa bakteerien bioluminesenssia eri parasetamolipitoisuuksilla.

Parasetamoli kasvatti myeloperoksidaasin kemiluminesenssivastetta jopa kymmenkertaisesti pienillä pitoisuuksilla ensimmäisen 15 minuutin aikana, jonka jälkeen sen vaikutus oli inhiboiva. Tämä havaittiin sekä happamassa että neutraalissa pH:ssa. Aktivaatio ja sitä seuraava inhibitio saavutettiin parasetamolin normaalilla käytöllä saavutettavilla pitoisuuksilla veressä, eli alle 22,5 µg/ml (150 µM) pitoisuuksilla. Aktivaatio ja inhibitio ei ollut yhtä voimakasta bakteeritapon reaktioissa, joissa happamassa pH:ssa parasetamolin vaikutus oli myös heikompaa. Suurimmillaan parasetamolin aiheuttama aktivaatio johti vain noin 10 %:in lisäykseen kuolleiden bakteerien määrässä. Tulosten perusteella parasetamoli vaikuttaa myeloperoksidaasin hypokloorihapokkeen muodostumiseen alle 22,5 µg/ml pitoisuuksilla merkittävästi sekä neutraalissa että happamassa pH:ssa. Lisäksi parasetamoli vaikuttaa myeloperoksidaasiin neutraalissa ja happamassa pH:ssa samalla tavalla sekä yhtä voimakkaasti. Parasetamolipitoisuus 22,5 µg/ml on saavutettavissa, kun lääkeainetta käytetään lääkärin ohjeiden mukaisesti, joten olisi tärkeää selvittää, mikä vaikutus myeloperoksidaasin inhibitiolla ja mahdollisella aktivaatiolla on ihmisen elimistön toiminnalle.

Avainsanat: Parasetamoli, myeloperoksidaasi, kemiluminesenssi, bioluminesenssi

Author: Joanna Lempiäinen
Title of thesis: The effects of paracetamol on myeloperoxidase function
Finnish title: Parasetamolien vaikutus myeloperoksidaasin toimintaan
Date: 20.1.2013 **Pages:** 44 + 1

Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Cell and Molecular Biology
Instructors: Esa-Matti Lilius (Dos.) and Janne Atosuo (FM) University of Turku
Supervisor Jari Yläne (Prof.) University of Jyväskylä

Abstract:

Myeloperoxidase is an enzyme found from neutrophils and monocytes. It converts hydrogen peroxide to hypochlorous acid and other bactericidal compounds. Myeloperoxidase has been considered a crucial enzyme for neutrophil bactericidal function because it is thought to enhance the bacterial killing of neutrophils significantly. However, recent studies have also proven that extracellular myeloperoxidase can have adverse effects in several diseases, like atherosclerosis and arthritis. Hypochlorous acid production by isolated myeloperoxidase and neutrophils can be measured non-specifically with luminol-dependent chemiluminescence. Bactericidal function of isolated myeloperoxidase and neutrophils can be monitored on a real-time basis by using bioluminescent *Escherichia coli* bacteria (*E. coli* -lux) which contain a luciferase gene from the *Photobacterium luminescens* bacterium. Light emitted from the reaction is directly proportional to the amount of living *E. coli* -lux bacteria. Paracetamol, a popular analgesic, inhibits hypochlorous acid production by myeloperoxidase with therapeutically achievable concentrations and has been found to inhibit the chemiluminescence response of isolated myeloperoxidase and neutrophils. The effect of paracetamol on myeloperoxidase bacterial killing has not been studied before, and chemiluminescence experiments with paracetamol have not been done on a real-time basis before.

Aim of this study was to investigate the effects of paracetamol on myeloperoxidase chemiluminescence and bacterial killing. Experiments were done in acid and neutral pH, because myeloperoxidase can be intracellular and reside in the acid phagolysosomes of neutrophils or it can be extracellular and function in neutral pH.

All measurements were done with a luminometer. Luminol-dependent chemiluminescence was used to measure the amount of hypochlorous acid produced by myeloperoxidase in the presence of paracetamol. In killing experiments, the amount of *E. coli* -lux bacteria was measured on a real-time basis in the presence of myeloperoxidase and paracetamol.

Low concentrations of paracetamol activated the myeloperoxidase chemiluminescence up to tenth fold in the first 15 minutes, after which the effect was inhibitory. This observation was made in acid and neutral pH. As expected, activation and inhibition was acquired with concentrations less than 22,5 µg/ml (150 µM), which is the therapeutically achievable concentration in plasma. Activation and inhibition in the killing experiments were not as strong as in the chemiluminescence experiments. The activation caused only a 10 % increase in the killing of bacteria by myeloperoxidase. According to the results of this study, paracetamol affects the hypochlorous acid production of myeloperoxidase at therapeutically achievable concentrations in neutral and acid pH. In addition, paracetamol seems to affect myeloperoxidase in a similar manner and with the same magnitude in both neutral and acid pH. Paracetamol concentration of 22,5 µg/ml in plasma can be achieved when the drug is used according to the recommendations of a doctor. Thus, in the future, it would be important to study the effects of myeloperoxidase inhibition and possible activation on the human body.

Keywords: Paracetamol, myeloperoxidase, chemiluminescence, bioluminescence

SISÄLLYSLUETTELO

ALKUSANAT
TIIVISTELMÄ
SISÄLLYSLUETTELO
LYHENTEET

1 JOHDANTO	7
1.1 Parasetamoli.....	7
1.1.1 Funktionaaliset ryhmät.....	8
1.1.2 Vaikutusmekanismi elimistössä.....	9
1.1.3 Hajoaminen elimistössä.....	11
1.1.4 Haittavaikutukset.....	12
1.1.5 Uudet käyttökohteet.....	14
1.2 Neutrofiilit.....	15
1.2.1 Hengitysryöpsähdys ja myeloperoksidaasin toiminta.....	16
1.2.2 Parasetamolin vaikutusmekanismi neutrofiileissä.....	19
1.2.3 Neutrofiilit parasetamolin aiheuttamassa maksavauriossa.....	21
1.2.4 Myeloperoksidaasi sairauden aiheuttajana.....	25
2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS	27
3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	29
3.1 Materiaalit.....	29
3.2 Menetelmät.....	29
3.2.1 <i>E. coli</i> -lux bakteerin kasvatus ja varastointi.....	29
3.2.2 Reaktiot.....	30
3.2.3 Luminometri.....	30
3.2.4 Tulosten käsittely.....	30
4 TULOKSET	31
4.1 Parasetamoli ja myeloperoksidaasin kemiluminesenssivaste.....	31
4.2 Parasetamoli ja myeloperoksidaasin bakteeritappo.....	33
5 TULOSTEN TARKASTELU	35
5.1 Parasetamoli ja myeloperoksidaasin kemiluminesenssivaste.....	35
5.2 Parasetamoli ja myeloperoksidaasin bakteeritappo.....	36
5.3 Loppupohdinta.....	37

LIITTEET (1 kpl)

LYHENTEET

BL	bioluminesenssi (engl. <i>bioluminescence</i>)
COX-1	syklo-oksygenaasi 1 (engl. <i>cyclooxygenase 1</i>)
COX-2	syklo-oksygenaasi 2 (engl. <i>cyclooxygenase 2</i>)
cps	Hidex-luminometrin yksikkö luminesenssille (engl. <i>counts per second</i>)
HBSS	Hankin tasapainotettu suolaliuos (engl. <i>Hank's balanced salt solution</i>)
HOBr	hypobromihapoke (engl. <i>hypobromous acid</i>)
HOCl	hypokloorihapoke (engl. <i>hypochlorous acid</i>)
KL	kemiluminesenssi (engl. <i>chemiluminescence</i>)
LB	Luria Bertani Broth -kasvatusliuos
MPO	myeloperoksidaasi (engl. <i>myeloperoxidase</i>)
NAPQI	N-asetyyli-p-bentsokiniini-imini

1 JOHDANTO

Tässä tutkielmassa käsitellään parasetamolin mahdollisia vaikutuksia ihmisen immuunipuolustukseen. Kirjallisuusosiossa käydään ensin läpi pelkästään parasetamoliin liittyviä asioita, kuten sen vaikutusmekanismeja ja tunnetuimpia haittavaikutuksia. Tämän jälkeen siirrytään neutrofiilien ja myeloperoksidaasin toimintaan, sekä siihen, miten parasetamoli niihin vaikuttaa. Tutkielman kokeellinen osuus koostuu kahdesta osasta, joista ensimmäisessä esitellään tuloksia parasetamolin vaikutuksista myeloperoksidaasin kemiluminesenssiin ja toisessa sen vaikutuksista myeloperoksidaasin bakteeritappoon.

1.1 Parasetamoli

Parasetamoli on kivun ja kuumeen lievitykseen tarkoitettu lääke, jota saa apteekeista ilman reseptiä ympäri maailmaa. Se lievittää tulehdusta vain heikosti, joten sitä ei luokitella tulehduskipulääkkeeksi. Euroopassa ensimmäinen ja kaikkein tunnetuin parasetamolia sisältävä tuote on Panadol, jonka myynti aloitettiin 50-luvulla Englannissa. Yhdysvalloissa parasetamoli tunnetaan nimellä asetaminofeeni (engl. *acetaminophen*) ja käytetyin parasetamolia sisältävä tuote siellä on Tylenol. Aasia on parasetamolin suurin tuottaja: vuonna 2010 Kiina ja Intia tuottivat 80 % maailman markkinoiden parasetamolista. Aasia on myös merkittävä parasetamolin käyttäjä, sillä samaisena vuonna se kulutti puolet maailmalle tuotetusta parasetamolista (CCM International, 2011).

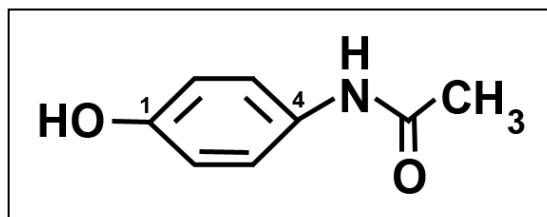
Harmon Morse syntetisoi parasetamolin ensimmäisen kerran vuonna 1878 Yhdysvalloissa Johns Hopkinsin yliopistossa (Jefferies ym., 2012). Lääke tuli ensimmäisen kerran markkinoille kuitenkin vasta vuonna 1953, sillä sen luultiin aiheuttavan vakavaa methemoglobiininemiaa (engl. *methaemoglobinemia*) (Jefferies ym., 2012). Tänä aikana Bayer keksi aspiriinin, josta tuli myös yksi maailman suosituimmista kipulääkkeistä (Jefferies ym., 2012).

Parasetamolin suosio johtuu todennäköisesti siitä, että se on edullinen ja aiheuttaa vain vähän sivuvaikutuksia normaaliannoksina. Se ärsyttää vatsan limakalvoja esimerkiksi vähemmän kuin aspiriini, ei ohenna verta, ja sitä voi käyttää useiden muiden lääkeaineiden

kanssa samanaikaisesti (Toes ym., 2005). Sitä pidetään myös parhaana kipulääkkeenä raskaana oleville naisille (Miners ym., 1986). Vaikka parasetamoli on yksi kaikkein tutkituimmista lääkeaineista, sen vaikutusmekanismi ei vielääkään ole täysin selvinnyt (Hinz ja Brune, 2012).

1.1.1 Funktionaaliset ryhmät

Parasetamoli on fenoli, jossa on substituentti para-asemassa hydroksyyli-ryhmään nähden (Kuva 1). Substituentti koostuu asetyyli- ja aminoryhmästä, jossa asetyyli-ryhmä on liittynyt typen kautta fenolirenkaaseen. Fenolirenkaan rakenne on olennainen lääkeaineen toiminnalle. Esimerkiksi ylimääräisen typen liittäminen renkaaseen saa sen inhiboimaan soijan lipo-oksygenaasia vahvemmin (Nam ym., 2009). Erityisesti muutoksia, jotka vaikuttavat fenolirenkaan hydroksyyli-ryhmään, pidetään sen toiminnalle merkittävinä (Blough ja Wu, 2011).

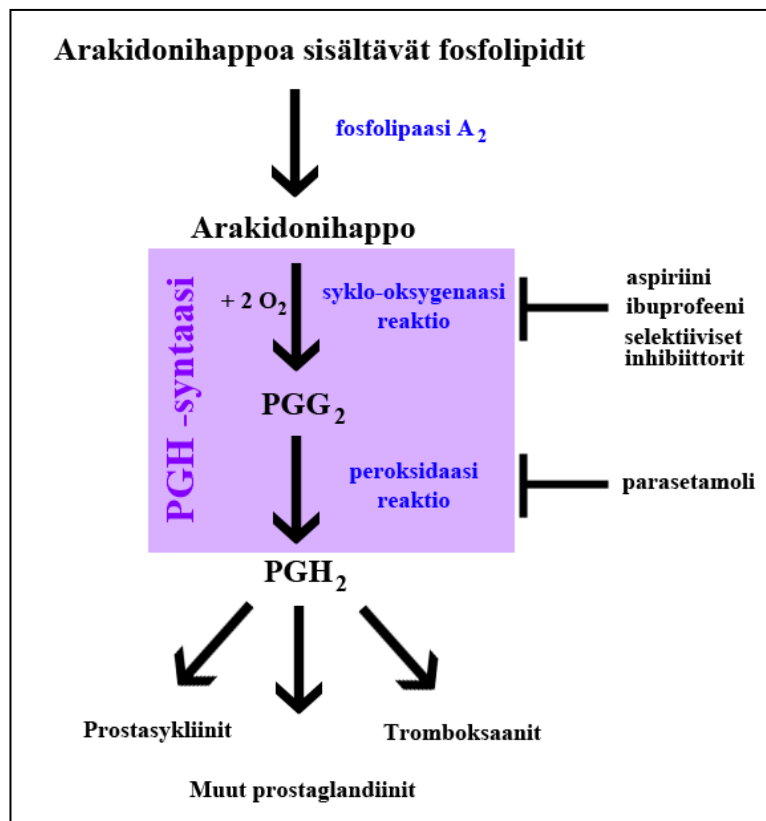


Kuva 1. Parasetamolin (N-asetyyli-4-aminofenoli) rakennekaava.

Parasetamoli voi myös inhiboida myeloperoksidaasientsyymiä (MPO), jota vapautuu aktivoituneista neutrofiileistä ja monosyyteistä (Koelsch ym., 2010). Se sitoutuu MPO:hon asetyyli- ja aminoryhmän sisältävän sivuketjun välityksellä. Sitoutuminen on pH:sta riippuvainen siten, että se on voimakkainta pH:ssa 4.5-6.0 ja heikkenee huomattavasti pH:sta 4.5 alaspäin mentäessä sekä pH:sta 6.5 ylöspäin mentäessä (van Zyl ym., 1989). Sivuketjun aminoryhmä todennäköisesti sitoutuu MPO:n hemin negatiivisesti varautuneisiin propionaattiryhmiin ionisella vuorovaikutuksella. Sitoutuminen on voimakkainta alhaisissa pH:issa, koska silloin parasetamolin aminoryhmä on kaikkein protonoitunein, ja sisältää positiivisen varauksen (van Zyl ym., 1989).

1.1.2 Vaikutusmekanismi elimistössä

Parasetamolin kuumetta alentava ja kipua lievittävä vaikutus perustuu selektiiviseen prostaglandiini H_2 :ta muodostavien syntaasien inhibitioon (Hinz ja Brune, 2012). Prostaglandiinisyntaaseja kutsutaan myös syklo-oksigenaaseiksi. Nisäkkäillä syklo-oksigenaaseja on kahden tyyppisiä, ja niillä on eri tehtävät. Syklo-oksigenaasi 1 (COX-1) syntetisoi prostaglandiineja, jotka säätelevät mahalaukun liman erittymistä ja ovat tärkeitä sydämen ja verisuonten toiminnalle. Syklo-oksigenaasi 2 (COX-2) puolestaan tuottaa prostaglandiineja, jotka säätelevät tulehdusta, kipua ja kuumetiloja (Garavito ja DeWitt, 1999). COX-1-syntaasi on jatkuvasti ilmentyneenä useimmissa kudoksissa, mutta COX-2 vain aivoissa ja munuaisissa. Muualla elimistössä COX-2:n ilmentyminen lisääntyy vain väliaikaisesti tulehdusvälittäjäaineiden vaikutuksesta (Herschman, 1996).



Kuva 2. Prostaglandiinisyntaasin toiminta ja eri kipulääkkeiden vaikutusmekanismit. Idea katsausartikkelin (Hinz ja Brune 2011, Fig. 1) kuvasta. PGH₂; prostaglandiini H₂, PGG₂; prostaglandiini G₂.

Perinteiset tulehduskipulääkkeet, kuten aspiriini ja ibuprofeeni, inhiboivat COX-1 ja COX-2 entsyymien syklo-oksigenaasireaktiota, jossa arakidonihaposta muodostuu prostaglandiini G₂:ta (Kuva 2). Ne kilpailevat arakidonihapon kanssa sitoutumisesta syntaasiin (Loll ym., 1996). Niillä on haitallisia vaikutuksia ruuansulatuskanavan limakalvolle, koska ne inhiboivat epäspesifisesti myös mahalaukun limakalvoja sääteleviä prostaglandiineja tuottavaa COX-1 entsyymiä. Vain COX-2 inhibitio on tarpeellinen kivun lievitykselle, joten on kehitetty kipulääkkeitä, jotka ovat selektiivisiä COX-2:lle (Garavito ja DeWitt, 1999).

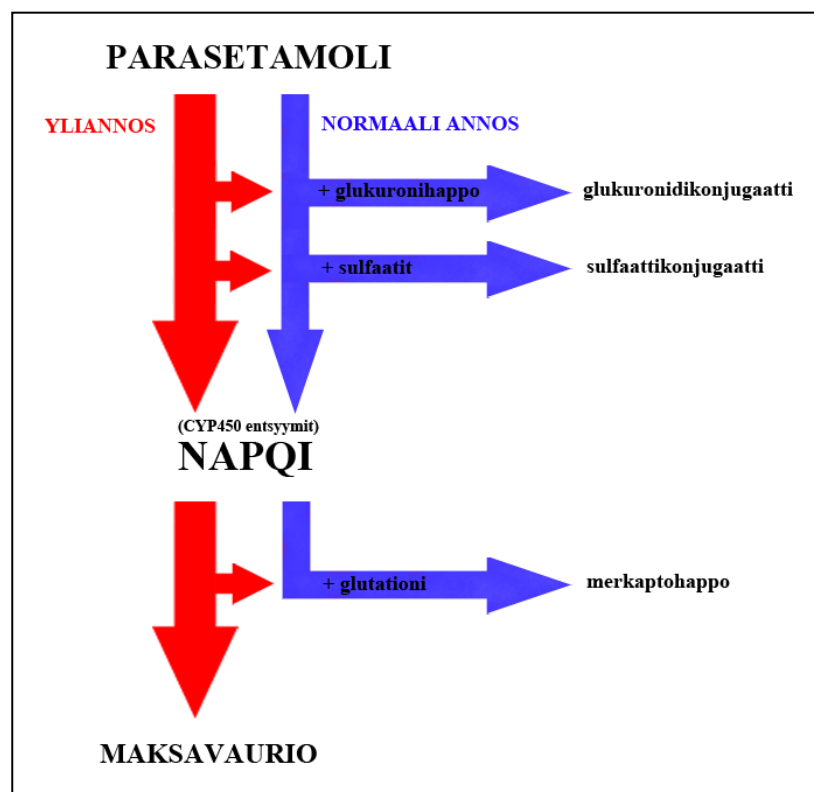
Perinteisistä tulehduskipulääkkeistä poiketen parasetamoli inhiboi syklo-oksigenaasien peroksidaasireaktiota, jossa prostaglandiini G₂:sta muodostuu prostaglandiini H₂:ta. Entsyymien peroksidaasipuolella hydroperoksidit hapettavat porfyriinin, joka puolestaan on tärkeä arakidonihapon hapettumiselle syntaasin oksygenaasipuolella. On ajateltu, että parasetamoli häiritseisi porfyriinin hapettumista ja estäisi tätä kautta prostaglandiinien muodostumisen (Ouellet ja Percival, 2001).

Korkea peroksidipitoisuus estää syklo-oksigenaasien inhibition parasetamolilla (Boutaud ym., 2002). Boutad ym. (2002) havaitsivat, että verihiutaleiden tuottama peroksidi estää parasetamolien aiheuttaman COX-1 inhibition täysin. Peroksidin lisääminen endoteelisoluihin puolestaan vähensi COX-2 inhibitiota, mutta ei kokonaan estänyt sitä (Boutaud ym., 2002). Tulehtuneissa kudoksissa arakidonihapon ja peroksidien pitoisuudet ovat normaalia suurempia. Parasetamolien vaikutus vähenee näissä olosuhteissa, mikä voisi selittää sen, ettei se toimi hyvin tulehduskipulääkkeenä (Graham ja Scott, 2005).

Parasetamoli inhiboi pääasiassa COX-2 entsyymiä ja vain heikosti COX-1:tä (Hinz ym., 2008), joten se vaikuttaa eri tavalla kuten perinteiset tulehduskipulääkkeet. Se esimerkiksi aiheuttaa vähemmän muutoksia vatsan limakalvolle (Peskar, 1977) heikon COX-1 inhibitionsa vuoksi (Hinz ja Brune, 2012). COX-1 tuottaa myös veren hyytymistä edesauttavia tromboksaaneja, joten parasetamoli ei ohenna verta samalla tavoin kuten esimerkiksi aspiriini ja ibuprofeeni (Catella-Lawson ym., 2001). Myös aspiriinin aiheuttama astma perustuu COX-1 inhibitioon (Jenkins ym., 2004).

1.1.3 Hajoaminen elimistössä

Lähes kaikki suun kautta nautittu parasetamoli imeytyy ruuansulatuskanavassa. Imeytyminen on nopeaa, ja tapahtuu pääosin ohutsuolessa (Heading ym., 1973). Yli 90 % veren parasetamolista liittyy maksassa glukuronihappoon ja sulfaatteihin ja erittyy elimistöstä virtsan mukana (Kuva 3). Osa jäljelle jäävästä parasetamolista hajoaa edelleen maksassa sytokromi P450-entsyymien toimesta, jolloin muodostuu *N*-asetyyli-p-bentsokiniini-iminiä (NAPQI). NAPQI on myrkyllinen tuote, jonka glutationi normaalisti muuttaa virtsassa eritettäväksi harmittomiksi yhdisteiksi (Nelson, 1990).



Kuva 3. Parasetamolin hajoaminen elimistössä. Oikeanpuoleiset nuolet (siniset) kuvaavat normaalin parasetamoliannoksen metaboloitumista ja vasemmanpuoleiset (punaiset) yliannoksen. Idea katsausartikkelin (Schilling ym. 2010, Fig. 1) kuvasta. CYP450; sytokromi P450.

Parasetamolin yliannostuksessa glukuronihapon ja sulfaattien kapasiteetti ei riitä sitomaan riittävää määrää parasetamolia. Tällöin lääkeainetta jää vereen ylimäärin, ja sytokromi P450-entsyymit muodostavat tavallista enemmän myrkyllistä NAPQI:tä. Koska NAPQI:tä on liikaa, ei glutationin kapasiteetti puolestaan riitä sitomaan kaikkea sitä. Jäljelle jäänyt NAPQI haittaa maksan entsyymien toimintaa muun muassa sitoutumalla hepatosyyttien makromolekyyleihin. Ylimäärä NAPQI:tä kuluttaa myös maksan glutationivarastot, jolloin glutationia ei jää käytettäväksi muihin maksan prosesseihin (Schilling ym., 2010).

1.1.4 Haittavaikutukset

Vaikka parasetamolilla on monia hyviä ominaisuuksia perinteisiin tulehduskipulääkkeisiin verrattuna, on se liika-annoksena hyvin myrkyllinen. Parasetamoli onkin lääkeaineista se, joka aiheuttaa kaikkein eniten maksavaurioita maailmassa (Jaeschke, 2006). Etenkin Yhdysvalloissa sen aiheuttamat maksavauriot ovat olleet viimeaikoina puheenaiheena (Schilling ym., 2010). Esimerkiksi vuonna 2006 lähes 140 000 Yhdysvaltalaisista kärsi parasetamolien aiheuttamasta myrkytyksestä, ja näistä ihmisistä yli 100 kuoli (Bronstein ym., 2007). Lähes puolet myrkytyksistä on tahattomia yliannostuksia, joissa potilas ei esimerkiksi ole tiennyt toisen käyttämänsä lääkkeen sisältävän myös parasetamolia. Loput tapauksista ovat tahallisia yliannostuksia (Bower ym., 2007; Schilling ym., 2010). Suositusten mukaan vuorokauden maksimiannos aikuisilla on 4 g (Schilling ym., 2010).

Suomessakin parasetamolimyrkytykset ovat viime vuosina lisääntyneet. Itsehoitolääkkeitä pidetään vaarattomina, joten niitä saatetaan pelkästään huolimattomuuden vuoksi syödä suosituksia enemmän. Annosraja saattaa myös huomaamatta ylittyä, jos tabletteja otetaan useita vuorokauden aikana. Yliannoksista on syytetty suurempia pakkaus- ja annoskokoja, jotka sallittiin vuonna 2009 ja 2010. Vuonna 2009 pakkauskokoja suurennettiin ja vuodesta 2010 lähtien yhden gramman parasetamolivalmistetta on voinut ostaa ilman reseptiä. Vaikka yliannostukset ovatkin Suomessa yleistyneet, ovat sen aiheuttamat kuolemat kuitenkin vielä harvinaisia (www.apteekkari.fi).

Parasetamoli voi vahingoittaa maksaa myös normaaliannoksilla, jos henkilö käyttää runsaasti alkoholia tai on aliravittu (Schilling ym., 2010). Lisäksi on olemassa lääkkeitä, jotka kiihdyttävät sytokromi P450-entsyymien toimintaa, jolloin normaalista parasetamoliannoksesta muodostuu tavallista enemmän NAPQI:tä (Larson, 2007). Parasetamoli saattaa harvoina tapauksina aiheuttaa myös nokkosihottumaa ja muita allergiareaktioita (Burke ym., 2006). Osittain selektiivisen COX-2 inhibitionsa vuoksi sen ei pitäisi aiheuttaa astmaa kuten perinteisten tulehduskipulääkkeiden (Hinz ja Brune, 2012). Settipane ym. (1995) kuitenkin havaitsivat, että yli neljäsosa heidän tutkimukseensa osallistuneista astmapotilaista saivat bronkospasmeja ottaessaan parasetamolia 1 g tai 1,5 g. Näistä tuloksista johtuen astmasta kärsiville suositellaan vain alle 1 g annoksia

parasetamolia (Hinz ja Brune, 2012). Parasetamoli voi myös inhiboida prostaglandiinien tuottoa endoteelisoluissa, sillä endoteelisoluissa peroksidien pitoisuus on alhainen (Boutaud ym., 2002). Pitkään jatkuva parasetamolin käyttö voikin pitää prostaglandiinien tuoton endoteelisoluissa alhaisena ja siten johtaa verenpaineen nousuun. Riski verenpaineen nousuun on kuitenkin samaa luokkaa kuin perinteisillä tulehduskipulääkkeillä (Hinz ja Brune, 2012).

Parasetamoli on lisäksi suosittu kivunlievittäjä muun muassa ortopedisten leikkausten jälkeen (Diaz-Rodriguez ym., 2010). Osteoblastit ovat tärkeitä uuden luukudoksen muodostumisessa, ja niillä on myös immunologisia tehtäviä. Ne esimerkiksi tuottavat sytokiinejä, kykenevät fagosytoimaan ja esittelevät antigeenejä T-soluille. Diaz-Rodriguez ym. (2010) tutkivat parasetamolin vaikutusta ihmisen osteosarkooma MG63-solulinjaan. He havaitsivat, että normaalirajoihin kuuluvat parasetamoliannokset (5 ja 25 μM eli 0,75 ja 3,75 $\mu\text{g/ml}$) heikentävät osteosarkoomasolujen jakautumista, vähentävät osteokalsiinin synteesiä, lisäävät antigeenien ilmentymistä solujen pinnalla ja vähentävät fagosytoosia.

Osteokalsiinin synteesi lisääntyy osteoblastien erilaistumisen loppuvaiheilla, joten näiden tulosten perusteella parasetamoli voisi haitata osteoblastien erilaistumista. Antigeenien ilmentymisen lisääntyminen ja fagosytoosin vähentyminen on tyypillistä muun muassa dendriittisoluille, kun ne infektiassa kohtaavat mikrobin tai sen tuotteen. Koska osteoblasteilla ja dendriittisoluilla on useita yhteneviä ominaisuuksia, kuten esimerkiksi sytokiinien tuotto ja antigeenien esittelemine T-soluille, voisivat nämä havainnot viitata jonkinlaiseen aktivaatioon osteoblasteissa. Samankaltaisia havaintoja on tehty myös makrofageilla ja fibroblasteilla, kun ne ovat jonkin lääkeaineen vaikutuksen alaisena (Diaz-Rodriguez ym., 2010). Osteoblastien aktivaation seurauksia Diaz-Rodriguez ym. (2010) eivät kuitenkaan sen enempää pohdiskele. On myös otettava huomioon, että perinteiset tulehduskipulääkkeetkin ovat tutkimuksissa vähentäneet luukudoksen kasvua ja uusiutumista (Evans ja Butcher, 2004; Diaz-Rodriguez ym., 2010).

1.1.5 Uudet käyttökohteet

Yllättäen Blough ja Wu (2011) lähestyvät parasetamolien vaikutuksia aivan uudelta kantilta. Useissa eläinkokeissa on nimittäin osoitettu, että pienillä annoksilla parasetamolilla on hyviä vaikutuksia veren sokeritasolle, lihaksille, sydämelle ja aivoille. Parasetamoli on tutkimuksissa muun muassa alentanut veren sokeritasoa ja edesauttanut insuliinitason ylläpitoa hiirillä (Shertzer ym., 2008). Tutkimuksia tehtiin diabeteksen hiirimalleilla ja runsasrasvaista ruokavaliota saavilla hiirillä.

Näiden tutkimusten lisäksi rotilla tehdyissä kokeissa havaittiin, että jatkuva alhainen parasetamolipitoisuus veressä lieventää ikääntymisestä aiheutuvaa veren sokeritason nousua (Wu ym., 2009a). Glukoosinkuljetusproteiini 4:n ilmentyminen heikkenee iän myötä, joten parasetamolien on ehdotettu vaikuttavan tämän transportterin ilmentymiseen (Wu ym., 2009a). Lisäksi parasetamolien on todettu vähentävän iän myötä tapahtuvaa lihassolujen apoptoosia rottamallisissa (Wu ym., 2009b). Lääke myös suurensi rottien lihassoluja, minkä on ehdotettu johtuvan lisääntyneestä myosiinin ja aktiinin ilmentymisestä (Wu ym., 2009b). Runsa rasvaista ravintoa saavilla hiirillä parasetamoli muun muassa esti hiirimallille ominaista lihasten surkastumista (Shertzer ym., 2008).

Marsuilla, koirilla ja gerbiileillä tehdyissä tutkimuksissa on todettu, että parasetamoli suojaa sydäntä useissa tautimalleissa. Esimerkiksi koirilla tehdyssä tutkimuksessa parasetamoli pienensi sydäninfarktin laajuutta (Merrill ym., 2004). Lääkkeen on todettu myös suojaavan hermosoluja eri hermostosairauksien rottamalleilla (Bisaglia ym., 2002; Maharaj ym., 2006). Se vähentää superoksidianionien tuottoa ja lipidien peroksidaatiota sekä vähentää soluvaurioita (Maharaj ym., 2006). Tämän lisäksi parasetamolien on todettu toimivan pieninä annoksina antioksidanttina, jolloin se sitoo lipidejä, proteiineja ja nukleiinihappoja hapettavia yhdisteitä. Näiden ylimääräisten positiivisten vaikutusten onkin ehdotettu perustuvan sen antioksidanttisiin ominaisuuksiin (Blough ja Wu, 2011). Kaikki edellä mainitut tutkimustulokset saatiin kuitenkin vain eläinkokeissa.

1.2 Neutrofiilit

Neutrofiilit ovat elintärkeitä immuunipuolustuksemme fagosyyttejä, jotka ovat ensimmäisinä paikalla, kun mikrobi tunkeutuu elimistöömme. Ne saapuvat infektiopaikalle verenkierron kuljettamina ja infektiopaikalta vapautuvien molekyylien houkuttelemina (Amulic ym., 2012). Saapuessaan infektiopaikalle ne fagosytoivat bakteereja, sieniä ja alkueläimiä, jotka ne lopulta tappavat tuottamallaan reaktiivisilla happiyhdisteillä ja proteaaseilla (Faurichou ja Borregaard, 2003). Neutrofiilien tehtävä ei kuitenkaan ole pelkästään mikrobien fagosytoosi, vaan ne ovat myös tärkeitä immuunipuolustuksen säätelijöitä (Cassatella ym., 2009).

Mikrobeja tappavat yhdisteet sijaitsevat neutrofiilien rakkuloissa, joita on kolmea tyyppiä: azurofiiliset rakkulat (primääriset), spesifiset rakkulat (sekundääriset) ja gelatinaasirakkulat (tertiääriset). Azurofiiliset rakkulat ovat peroksidaasipositiivisia, ja ne sisältävät runsaasti muun muassa MPO:ta. Muut rakkulat ovat puolestaan peroksidaasinegatiivisia. Spesifisissä rakkuloissa on runsaasti laktoferriniä, mutta vähän gelatinaasia, ja gelatinaasirakkuloissa on puolestaan runsaasti gelatinaasia, mutta vähän laktoferriniä (Faurichou ja Borregaard, 2003).

Fagosytoosissa neutrofiilin azurofiiliset rakkulat fuusioituvat fagolysosomiin, jolloin niiden sisältämät mikrobeille myrkylliset yhdisteet vapautuvat fagolysosomin sisälle. Osa reaktiivisista happiyhdisteistä ja proteaaseista vapautuu myös solun ulkopuolelle. Tämän vuoksi neutrofiilit voivat vaurioittaa isäntänsä soluja ja kudoksia (Cassatella ym., 2009). Kemokiinit säätelevätkin neutrofiilien vapautumista luuytimestä vereen hyvin tiukasti ja elimistö pyrkii käyttämään niitä vain oikeassa paikassa oikeaan aikaan (Amulic ym., 2012). Neutrofiilien määrä lisääntyy huomattavasti vain infektion aikana, ja ne kuuluvat lyhytikäisimpiin soluihimme (Amulic ym., 2012). Kudoksiin vaeltavat neutrofiilit elävät noin 1-2 vuorokautta ja ne jotka jäävät verenkiertoon noin 5 vuorokautta (Hedman ym., 2011).

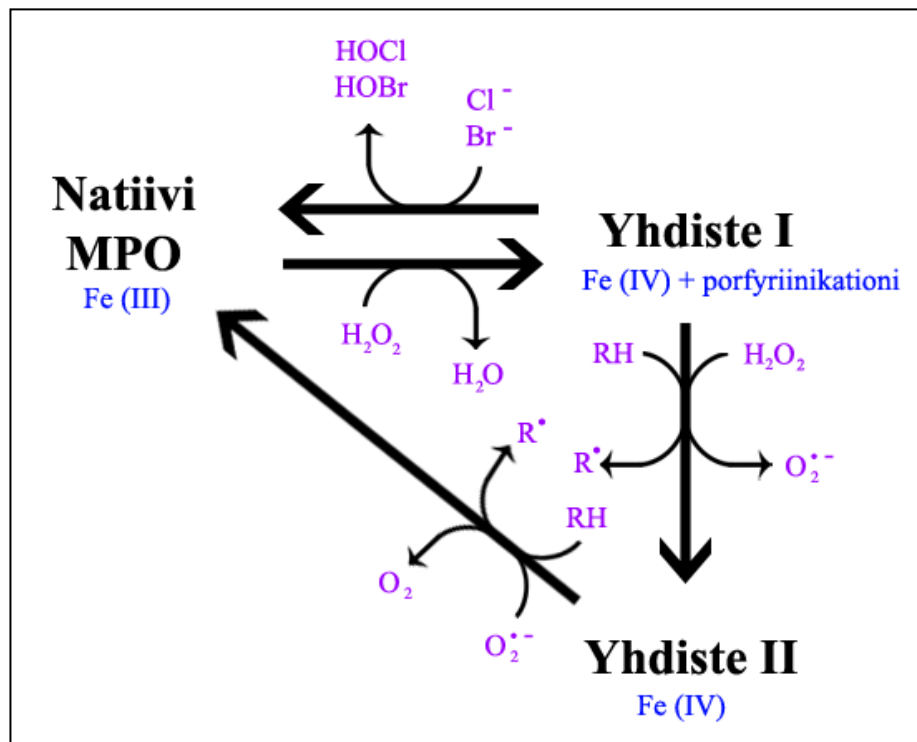
1.2.1 Hengitysryöpsähdys ja myeloperoksidaasin toiminta

Ennen kuin neutrofiili voi fagositoida kohteensa, on kohdepartikkelin sitouduttava sen pinnan reseptoreihin. Komplementti- ja Fc-reseptorit tunnistavat opsonoituja mikrobeja, eli mikrobeja, joiden pintaan on sitoutunut komplementtiproteiineja ja vasta-aineita tunnistuksen helpottamiseksi (Kemp ja Turner, 1986). Opsonoimattomien partikkelien fagositointi on myös mahdollista, mutta se on tehottomampaa, ja tapahtuu pääosin lektiinien välityksellä. Sitoutumisen seurauksena neutrofiili ottaa partikkelin sisäänsä ja aktivoituu (Kemp ja Turner, 1986).

Partikkelin fagositointi käynnistää neutrofiilin hengitysryöpsähdysten (engl. *respiratory burst*), eli reaktioiden ketjun, jossa kuluu runsaasti happea ja muodostuu mikrobeille myrkyllisiä hapen reaktiivisia yhdisteitä (engl. *reactive oxygen species*). Hengitysryöpsähdysten alussa neutrofiilien membraanin NADPH-oksidaasi alkaa pelkistää happimolekyylejä superoksidianioneiksi solun ulkopuolelle, fagosomiin ja rakkuloihin (Dahlgren ja Karlsson, 1999). Superoksidianionit muuttuvat vetyperoksidiksi spontaanisti tai superoksididismutaasin katalysoimana, jonka jälkeen MPO muuttaa vetyperoksidin muiksi bakteereille myrkyllisiksi yhdisteiksi, kuten hypokloorihapokkeeksi (HOCl), hypobromihapokkeeksi (HOBr) ja hypotiosyanidihapoksi (HOSCN). Neutrofiilin aktivoituessa osa MPO:sta vapautuu myös solun ulkopuolelle (Allen ym., 1972; Lilius ja Nuutila, 2006).

MPO:ta pidetään tärkeänä tekijänä neutrofiilien mikrobitapolle, sillä se muodostaa vetyperoksidista moninkertaisesti myrkyllisempiä yhdisteitä. MPO:ta on neutrofiileilla runsaasti: n. 1-5 % niiden kuivapainosta. Entsyymi koostuu kahdesta painavammasta (55-63 kDa) ja kahdesta kevyemmästä (10-15 kDa) alayksiköstä (Jantschko ym., 2003). Natiivi entsyymi on kooltaan 120-160 kDa ja se muodostuu kahdesta protomeeristä, joista kumpikin sisältää yhden pienen ja yhden ison alayksikön. Rikkisilta isojen alayksikköjen välissä pitää protomeerit yhdessä. Kumpikin iso alayksikkö sisältää hiilihydraattiosia ja niissä on kovalenttisesti kiinni rautaa sisältävä hemi (Nuutila, 2003).

MPO voi esiintyä eri muotoina riippuen sen hemin raudan hapetusluvusta (Kuva 4). Natiivissa muodossa entsyymän hemin rauta on hapetusluvulla III ja se reagoi herkästi vetyperoksidin kanssa. Reagoidessaan vetyperoksidin kanssa MPO muuttuu yhdisteeksi I (engl. *compound I*), jossa sen porfyriini on kationimuodossa ja rauta hapetusluvulla IV. Yhdiste I muuttuu takaisin natiiviksi vetyperoksidia sitovaksi muodoksi, kun se katalysoi kloridi- ja bromidi-ionien muuttumista HOCl:ksi ja HOBr:ksi. Lisäksi yhdiste I voi edelleen muuttua yhdisteeksi II (engl. *compound II*) vetyperoksidin välittämänä tai kun se hapettaa aromaattisia yhdisteitä (RH), kuten fenoleita. Yhdiste II voi puolestaan pelkistyä takaisin entsyymän natiiviksi muodoksi aromaattisten yhdisteiden tai superoksidianionin vaikutuksesta (Jantschko ym., 2003). Natiivi MPO voi myös muuttua yhdisteeksi III (engl. *compound III*), jos se reagoi suoraan superoksidianionin kanssa. Kun yhdiste III pelkistyy edelleen superoksidianionin vaikutuksesta, siitä muuttuu yhdiste I ja reaktiossa vapautuu happea. Yhdisteen III kautta MPO pystyy näin estämään liiallisen superoksidianionien kertymisen (Nuutila, 2003).



Kuva 4. MPO:n halogenaatiosykli. Yksinkertaistamisen vuoksi yhdisteen III reaktiot on jätetty pois. Idea artikkelien (Koelsch ym. 2010, Fig. 1 ja Jantschko ym. 2003, Fig 4) kuvista.

Osa hengitysröpsähdyksessä muodostuvista happiyhdisteistä ovat energialtaan virittyneessä tilassa ja palatessaan energian normaalitasolle tuottavat valoa. Tätä tuottuvaa valoa kutsutaan neutrofiilien kemiluminesenssiksi (KL) (Allen ym., 1972) ja sitä voidaan vahvistaa erilaisilla yhdisteillä, kuten esimerkiksi luminolilla (Lilius ja Marnila, 1992). Luminoli reagoi tällöin reaktiivisten happiyhdisteiden kanssa, jolloin siitä muodostuu virittynyt aminoftalaatti-ioni, joka puolestaan emittoi fotonin 427 nm allonpituudella palatessaan alemmalle energiatasolle (Nuutila 2003). Luminoli (5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni) on myös tutkimuksissa kaikkein eniten käytetty KL:n vahvistaja (Dahlgren ja Karlsson, 1999). Yksi luminolimolekyylillä tuottaa verrattain suuren määrän valokvantteja, joten se on herkkä KL:n vahvistaja (Dahlgren ja Karlsson, 1999). Se voikin vahvistaa neutrofiilin luonnollisen KL:n tuhannesta kymmentuhatkertaiseksi (Nuutila, 2003). Luminolin tuottama valo on pääosin MPO:sta peräisin (Cohen ym., 1983), ja koska neutrofiilin hengitysröpsähdyksessä MPO:ta erittyy myös solun ulkopuolelle, tulee myös osa luminolin vahvistamasta valosta solun ulkopuolelta (Nuutila, 2003).

Ei ole ollut täysin selvillä, mikä molekyyli luminolin saa virittymään (Dahlgren ja Karlsson, 1999), mutta ainakin Koelsch ym. (2010) mukaan luminolivahvistein KL on epäspesifinen HOCl:n muodostumisen mitta. Luminolivahvistetun KL:n riippuvuus reaktiivisista happiyhdisteistä osoitettiin käyttämällä kroonisen granulomatoottisen taudin potilaiden neutrofiilejä apuna. Taudista kärsivät ovat alttiita bakteeri- ja sieni-infektioille, sillä heidän fagosyyttinsä eivät pysty muodostamaan reaktiivisia happiyhdisteitä. Neutrofiilien puutteellisen NADPH-oksidaasin vuoksi ei reaktiivisia happiyhdisteitä ja siten luminolivahvistetusta KL-vastetta muodostu (Dahlgren ja Karlsson, 1999). MPO-vajaat neutrofiilit tuottavat myös normaalia matalamman luminolivasteen, ja MPO:n lisäys näihin soluihin palauttaa vastetta jonkin verran (Dahlgren ja Karlsson, 1999). Neutrofiilien KL:ää mittaamalla voidaan esimerkiksi tutkia erilaisten sairauksien tai lääkeaineiden vaikutuksia fagosyyttien aktiivisuuteen (Nuutila, 2003; Benbarek ym., 2012).

1.2.2 Parasetamolin vaikutusmekanismi neutrofiileissä

Koska parasetamoli on fenoli (RH kuvassa 4), se hapettuu MPO yhdisteen I ja II katalysoimana. Kun parasetamoli muuttaa yhdisteen I yhdisteeksi II, se samalla myös estää kloridi- ja bromidi-ionien hapettumisreaktion, sillä vain MPO yhdiste I kykenee katalysoimaan tätä reaktiota. Toisaalta se ohjaa yhdisteen II muuttumista natiiviksi MPO:ksi ja voi näin ollen edistää hypohapokkeiden muodostumista lisäämällä natiivin MPO:n määrää (Koelsch ym., 2010). Parasetamolin onkin todettu stimuloivan HOCl:n muodostumista pienillä pitoisuuksilla ja inhiboivan suuremmilla. Selitykseksi on ehdotettu, että pienemmillä pitoisuuksilla se muuttaa yhdisteitä II ja III natiiviksi MPO:ksi, mutta suuremmilla pitoisuuksilla alkaakin kilpailla kloridi-ionien kanssa yhdisteeseen I sitoutumisesta (Marquez ja Dunford, 1993; Koelsch ym., 2010). Tällä hetkellä parasetamolin vaikutuksista HOCl:n muodostumiseen tiedetään enemmän kuin HOBr:n (Koelsch ym., 2010).

Koska siis parasetamoli kilpailee kloridi-ionien kanssa MPO:hon sitoutumisesta, on sen läsnä ollessa HOCl:n kokonaistuotto normaalia pienempi sekä eristetyllä MPO:lla että kokonaisilla neutrofiileillä (Graham ym., 1999). Eristetyllä MPO:lla pienet parasetamolipitoisuudet nopeuttavat HOCl:n tuottoa vain aluksi, ja HOCl:n kokonaismäärä on myöhemmin mitattuna normaalia alhaisempi (Koelsch ym., 2010). Kokonaisilla neutrofiileillä parasetamolin vaikutus on HOCl:n tuottoa vähentävä (Graham ym., 1999). On todettu, että MPO käyttää 40 % neutrofiilien vetyperoksidista HOCl:n muodostamiseen (Weiss ym., 1982). Jos HOCl on neutrofiilien mikrobitapolle merkittävä yhdiste, voi sen vähenemisellä olla haitallisia vaikutuksia neutrofiilien kyvyille tappaa mikrobeja (van Zyl ym., 1989).

Zyl ym. (1989) huomasivat, että parasetamoli ei pelkästään kilpaile kloridi-ionien kanssa MPO:hon sitoutumisesta vaan kykenee lisäksi sitomaan valmista HOCl:ää. Koska HOCl:n bakterisidinen vaikutus perustuu siihen, että se katkoo tehokkaasti peptidejä (Thomas, 1979), käyttivät Zyl ym. (1989) muodostuvan HOCl:n määrän merkkinä tyroglobuliinin pilkkoutumista. Parasetamoli esti tyroglobuliinin pilkkoutumisen pitoisuudella 3,3 mM (500 µg/ml) lähes täysin ja pitoisuudella 0,7 mM (105 µg/ml) näkyvästi. Parasetamolin

maksimipitoisuus veressä normaaliannostuksella on alle 150 μM (22,5 $\mu\text{g/ml}$) (Koelsch ym., 2010), joten näkyvät muutokset saatiin tässä tutkimuksessa yliannostuksen pitoisuuksilla.

Shalabi (1992) tutki parasetamolin vaikutusta eristettyjen neutrofiilien hengitysyöpsähdykseen käyttäen luminolivahvisteista KL:ää reaktiivisten happiyhdisteiden muodostumisen mittana. Neutrofiilien aktivoijana hän käytti phorbolimyristaattiasetaattia (engl. *phorbol myristate acetate*) ja opsonoitua tsymosaania. Hän havaitsi, että parasetamoli pienentää neutrofiilien KL-vastetta merkittävästi jo pitoisuudella 0,1 μM , joka on huomattavasti alle terapeuttisesti saatavan pitoisuuden plasmassa (< 150 μM , Koelsch ym., 2010).

Pari vuotta sitten Koelsch ym. (2010) saivat samankaltaisia tuloksia. Parasetamolipitoisuus 10 μM vähensi neutrofiilien KL:än 70 %:iin normaalitasosta. Lisäksi he käyttivät KL-mittausten rinnalla tauriinia HOCl pitoisuuden määrittämiseen, jolloin HOCl:n määrä oli 70 % normaalitasosta vasta 50 μM parasetamolipitoisuudella. KL:ää mitattaessa parasetamolin vaikutus neutrofiileihin vaikutti siis merkittävämmältä. Kuitenkin sekä KL:n että tauriinin mittauksissa merkittävät tulokset saatiin parasetamolin normaalikäytön pitoisuuksilla (< 150 μM).

Myös Shalabin (1992) tekemässä tutkimuksessa parasetamoli heikensi neutrofiilien fagocytoosia merkittävästi 10 μM parasetamolipitoisuudella. Kokeessa neutrofiilien annettiin fagosytoida kuolleita opsonoituja hiivasoluja, minkä jälkeen hiivapartikkelien määrä laskettiin 200 neutrofiilistä mikroskoopilla. Hän päätteli, että parasetamoli joko vähensi hiivasoluihin tarttuvien reseptorien affiniteettia tai häytti jollakin muulla tavalla signaalinvälitystä solussa. Parasetamoli myös vähensi neutrofiilien superoksidianionien tuottoa, jonka muun muassa Abramsonin ym. (1990) olivat havainneet aiemmin. Shalabi (1992) päätteli, että parasetamoli voisi inhiboida MPO:n lisäksi myös superoksidianioneja tuottavaa NADPH:ta. Tosin myöhemmin Graham ym. (1999) ja Koelsch ym. (2010) totesivat, että parasetamoli ei vähennä neutrofiilien superoksidianionien tuottoa.

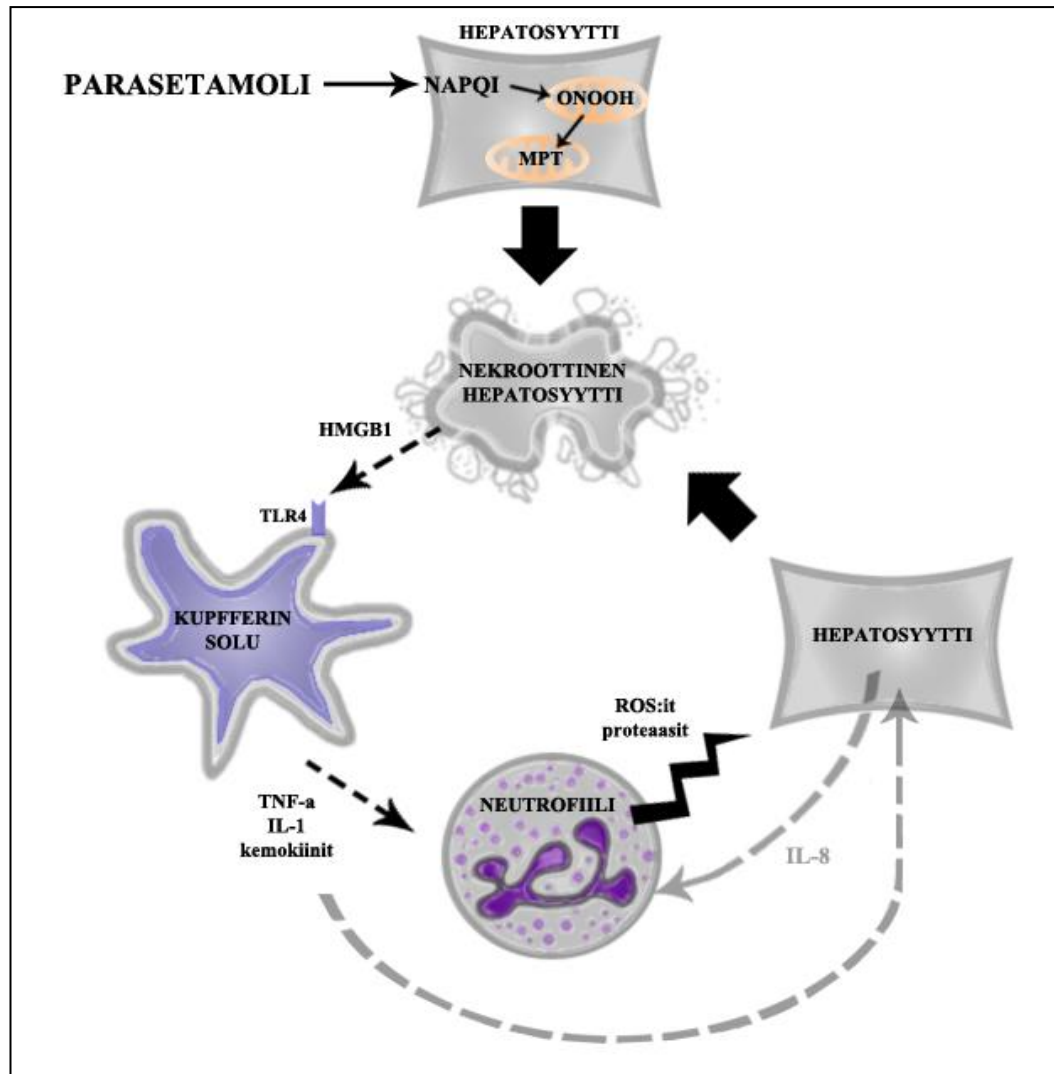
Muutama vuosi myöhemmin Shalabi ja Al-Tuwaijri (1996) huomasivat, että parasetamolin inhiboiva vaikutus neutrofiileissa on voimakkain normaalia ruumiinlämpöä korkeammissa lämpötiloissa. Neutrofiilien hengitysyryöpsähdyksen on todettu olevan voimakkaampi +39 °C:ssa kuin +37 °C:ssa ja niiden kunnon heikkenevän +42 °C:een mentäessä (Shalabi ja al-Tuwaijri, 1996). Neutrofiilien toiminnan tehostuminen voi olla elimistön tapa taistella entistä tehokkaammin infektiota vastaan kuumetilassa. Shalabi ja Al-Tuwaijri (1996) havaitsivat, että jo 0,1 µM parasetamolipitoisuus estää +39 °C:ssa neutrofiilien KL-vastetta enemmän kuin +37 °C:ssa. Tulokset saatiin sekä eristetyillä neutrofiileilla, että kokoverellä. Näistä tuloksista Shalabi ja Al-Tuwaijri (1996) päättelivät, että kuumeisilla potilailla parasetamoli saattaa vähentää neutrofiilien aktiivisuutta merkittävästi, ja siten aiheuttaa erityistä haittaa potilaille, joilla on jo muutenkin vajavainen immuunipuolustus esimerkiksi jonkin sairauden vuoksi.

1.2.3 Neutrofiilit parasetamolin aiheuttamassa maksavauriossa

Parasetamolin metaboloitumisessa muodostuva NAPQI sitoutuu hepatosyyttien proteiineihin ja kuluttaa maksan tärkeitä glutationivarastoja (Jaeschke, 2006). Glutationilla on useita merkittäviä tehtäviä soluissa. Se muun muassa pelkistää elimistöön uutena tulevia tai aineenvaihdunnassa syntyviä vaarallisia yhdisteitä vaarattomiksi, ylläpitää solunsisäistä pelkistyspotentiaalia, toimii antioksidanttina pelkistäen vapaita radikaaleja, on kysteiinivarasto ja toimii signaalinvälityksessä sekä apoptoosissa (Main ym., 2012). Glutationivarastojen loppumisesta johtuva oksidatiivinen stressi maksasoluissa on todettu yhdeksi maksavaurion laukaisevaksi tekijäksi (Jaeschke, 2006; McGill ym., 2011).

Maksatoksisuuden ensimmäisessä vaiheessa NAPQI sitoutuu hepatosyyttien mitokondrioiden proteiineihin estäen niiden toiminnan (Kuva 5). Häiriintyneet mitokondriot alkavat tuottaa muun muassa reaktiivista happea ja peroksinitriittiä (ONOOH), jotka puolestaan aiheuttavat oksidatiivista stressiä mitokondrioihin. Oksidatiivinen stressi aiheuttaa mitokondrion membraanin läpäisevyyttä säätelevän huokosen (MPT, engl. *mitochondrial permeability transition pore*) aukeamisen, ja huokosen aukeaminen puolestaan mitokondrioiden membraanipotentialin häviämisen. Ilman mitokondrioiden membraanipotentialia hepatosyytti ei kykene tuottamaan

riittävästi ATP:tä (Jaeschke, 2006). Vaurioituneet mitokondriot vapauttavat myös endonukleaasi G:tä ja sytokromi C:tä, jotka kulkeutuvat tumaan ja aiheuttavat DNA:n fragmentaatiota (Jaeschke ja Bajt, 2006). Näiden tapahtumien seurauksena hepatosyytti kuolee yleensä nekroottisesti (Jaeschke, 2006).



Kuva 5. Neutrofiilien toiminta parasetamolin aiheuttamassa maksavauriossa. Idea katsausartikkelin (Jaeschke 2006, Fig. 1) kuvasta. MPT; mitokondrion membraanin läpäisevyyttä säätelevä huokonen, ONOOH; peroksinitriitti, ROS; hapen reaktiiviset yhdisteet.

Parasetamolin yliannostuksessa hepatosyyttejä kuolee kuitenkin hyvin laajalla alueella. Onkin ehdotettu, että nekroottisesti kuolevat hepatosyytit aiheuttaisivat tulehdusreaktion, jonka seurauksena NAPQI:n aiheuttama maksavaurio laajenisi entisestään (Jaeschke, 2006). Teorian mukaan nekroottisesti kuolevista hepatosyyteistä vapautuu HMGB1-proteiinia (engl. *high mobility group box-1*), joka aktivoi maksan Kupfferin soluja tuottamaan sytokiinejä ja kemokiinejä. Sytokiinit ja kemokiinit puolestaan aktivoivat ja

houkuttelevat paikalle neutrofiilejä, sekä aktivoivat hepatosyyttejä. Aktivoituneet hepatosyytit voivat edelleen tuottaa neutrofiilejä houkuttelevaa interleukiini 8:aa.

Neutrofiilien tehtävänä on maksaan tullessaan poistaa kuollutta kudosta uuden tieltä. Paikalle saapuessaan ne kuitenkin epäspesifinä tappavat häiriintyneitä hepatosyyttejä, jotka voisivat vauriostaan vielä toipua. Solut kuolevat nekroottisesti neutrofiilien vapauttamien proteaasien ja reaktiivisten happiyhdisteiden vaikutuksesta. Muodostuu kierre, jossa soluja kuolee ja neutrofiilejä ohjautuu paikalle yhä enemmän (Jaeschke, 2006). Nekroottisesti kuolleiden solujen sisältä vapautuvat aineet voivat Kupfferin solujen aktivoimisen lisäksi toimia suorana houkuttimena neutrofiileille, kuten esimerkiksi lipidiperoksidaation tuotteet. Vapautuvat aineet voivat myös sellaisenaan vaurioittaa lähellä olevia soluja. Esimerkiksi kalsiumilla säädeltävät proteaasit, kalpaiinit, ovat maksavaurion laajenemisessa merkittäviä tekijöitä (Ramaiah ja Jaeschke, 2007).

Neutrofiilit ovat osallisena esimerkiksi iskemia-reperfuusio vauriossa ja alkoholin sekä lääkkeiden, kuten naftyyli-isotiosyanaatin aiheuttamassa maksatoksisuudessa (Ramaiah ja Jaeschke, 2007). On kuitenkin kiistanalaista, pahentavatko neutrofiilit parasetamolin aiheuttamaa maksavauriota. Ainakin on varmaa, että neutrofiilejä kertyy maksan verisuonistoon parasetamolin yliannostuksessa (Jaeschke, 2006). Scaffidi ym. (2002) havaitsivat, että HMGB1-proteiinin neutralointi vasta-aineilla heikentää nekroottisten solujen aiheuttamaa tulehdusreaktiota. Koska apoptoottiset solut eivät vapauta HMGB1:tä tai aiheuta tulehdusreaktiota, on HMGB1:n oltava merkittävä signaalinvälittäjä nekroottisten solujen aiheuttamassa tulehdusreaktiossa. Yohe ym. (2006) puolestaan huomasivat, että hiirillä, joilta puuttuu toll-proteiinin kaltainen reseptori 4 (TLR4; engl. *Toll-like receptor 4*), on parasetamolin aiheuttama maksavaurio lievempi kuin normaaleilla hiirillä. Näin ollen tällä reseptorilla voisi olla jonkinlainen osuus parasetamolin aiheuttamassa maksavauriossa.

Myös Liu ym. (2006) tekemä tutkimus tukee tätä tulehdusreaktion teoriaa. He havaitsivat, että toksisen parasetamoliannoksen aiheuttama maksavaurio hiirillä pienenee, jos hiirille annetaan neutrofiilien määrää alentavaa anti-Gr-1 vasta-ainetta ennen parasetamoliannosta. Näillä hiirillä neutrofiilien määrä maksassa oli pienempi kuin kontrollihiirillä ja ne myös

säilyivät todennäköisemmin hengissä. Samanlaisia tuloksia saivat myös Ishida ym. (2006) anti-Gr-1 vasta-aineella. Liu ym. (2006) puolestaan huomasivat, että solujen välisen adheesiomolekyylin 1:n (ICAM-1) puuttuminen suojaa hiiriä maksavauriolta. Neutrofiilit käyttävät tätä adheesiomolekyylä kiinnittyessään hepatosyytteihin maksan tulehdusreaktiossa.

Toisaalta useissa tutkimuksissa neutrofiilien osuus parasetamolin aiheuttamaan maksavaurioon on kyseenalaistettu. Esimerkiksi Cover ym. (2006) totesivat, vastoin Liu ym. (2006) saamia tuloksia, ettei solujen välisen adheesiomolekyylin 1:n inhibiitio suojaa hiiriä parasetamolin aiheuttamalta maksavauriolta. Neutrofiilien β_2 -integriinien β -alayksikön inhibitiokaan ei suojannut hiiriä (Lawson ym., 2000), ja NADPH –oksidiaasin alayksikön inhibitiolla (James ym., 2003) sekä kemiallisilla inhibiittoreilla (Cover ym., 2006) ei myöskään ollut vaikutusta. Lisäksi on havaittu, että Anti-Gr-1 vasta-aineen lisääminen parasetamolin jälkeen ei suojaa hiiriä maksavauriolta (Cover ym., 2006). Anti-Gr-1:n epäilläänkin aktivoivan suojaavia geenejä ja stressiproteiineja, joiden suojaava vaikutus toimii vain silloin, kun ne on aktivoitu ennen parasetamolin lisäystä (Jaeschke ja Liu, 2007).

Vaikka neutrofiilien osuus parasetamolin aiheuttamassa maksavauriossa onkin kiistanalainen aihe, on ainakin parasetamolin aiheuttama hepatosyyttien nekroosi todistettu sekä hiirten että ihmisten soluilla (Jaeschke ym., 2012). Ihmisen kantasoluista saadulla hepatosyyttisolulinjalla HepaRG:llä on parasetamolin vaikutukset todettu hyvin samankaltaisiksi kuin hiirellä *in vivo* ja *in vitro*. McGill ym. (2011) huomasivat, että NAPQI liittyy HepaRG soluissa proteiineihin, aiheutti glutationin hävikkiä, mitokondrioihin oksidatiivista stressiä ja peroksinitriitin muodostumista sekä lopulta mitokondrioiden vajaatoimintaa. Kaikkien näiden tekijöiden seurauksena hepatosyytit kuolivat nekroottisesti.

1.2.4 Myeloperoksideasi sairauden aiheuttajana

MPO:n tuottamat HOCl, HOBr ja hypotiosyanidihappo ovat voimakkaita hapettimia, jotka voivat solun ulkopuolella vahingoittaa ympäröivää kudosta. Näiden hapettimien on todettu pahentavan muun muassa ateroskleroosia ja nivelreumaa (Koelsch ym., 2010). On esimerkiksi tehty useita löydöksiä, jotka viittaavat siihen, että MPO:n toiminta pahentaa sydän- ja verisuonitauteja. MPO:ta ja sen tuotteita on löydetty muun muassa ateroskleroottisista plakeista. Sydän- ja verisuonitauteja on myös todettu olevan vähemmän niillä, joilla MPO ei toimi kunnolla ja toisaalta korkeita MPO:n pitoisuuksia on pidetty ennusteena lisääntyneelle sydäninfarktin riskille (Nicholls ja Hazen, 2005).

Ateroskleroosia pahentava MPO on todennäköisesti peräisin plakkien makrofageista (Shao ym., 2012). MPO:n tuotteet muodostavat muun muassa klorotyrosiinia, nitrotyrosiinia, dityrosiinia ja klorinoituja lipidioksidation tuotteita plakkeihin. Näitä tuotteita on löydetty runsaasti myös plakeista eristetystä LDL-kolesterolista (engl. *low density lipoprotein*), mutta ei samoissa määrin terveen ihmisen veressä kiertävästä LDL:stä (Nicholls ja Hazen, 2005). Osa MPO:n tuotteista hapettaa LDL:än makrofageille helpommin otettavaan muotoon, jolloin ateroskleroottisille plakeille ominaisten lipidirikkaiden makrofagien, vaahtosolujen (engl. *foam cell*), muodostuminen helpottuu (Nicholls ja Hazen, 2005).

HDL-kolesteroli (engl. *high density lipoprotein*) suojaa valtimoiden seinämiä poistamalla vaahtosoluista ylimääräistä kolesterolia. MPO haittaa HDL:n toimintaa klorinoimalla ja nitroimalla HDL:n tärkeää apoA-I proteiinia. Muokkaantunutta apoA-I:tä sisältävät HDL-partikkelit poistavat kolesterolia vaahtosoluista normaalia tehottomammin, joten tämäkin MPO:n tuotteiden ominaisuus helpottaa plakin muodostumista edelleen (Shao ym., 2012). Hiiren ateroskleroosimallissa MPO:n osuutta sydän- ja verisuonitauteihin ei kuitenkaan ole pystytty osoittamaan. Lajien välisiä eroja on epäilty tähän syyksi (Nicholls ja Hazen, 2005).

Reumapotilailla on havaittu tavallista korkeampi MPO:n pitoisuus veressä, mutta MPO:n varsinaisen rooli reumassa on edelleen kiistanalainen. On ehdotettu, että nivelnesteessä olevien neutrofiilien vapauttama MPO sitoutuisi makrofagien pintaan ja saisi ne siten

aktivoitumaan. Aktivoituneet makrofagit puolestaan tuottaisivat sytokiinejä, jotka houkuttelisivat lisää neutrofiilejä paikalle. Näin tulehdus edelleen laajenisi MPO:n toimiessa tärkeänä immuunipuolustuksen säätelijänä. Tämän lisäksi MPO:n tuotteet olisivat osallisina tulehdusreaktiossa (Fernandes ym., 2012).

Ateroskleroosin ja reuman lisäksi MPO:n tuottamien hapettimien on ehdotettu pahentavan muun muassa astmaa, kystistä fibroosia, munuaissairauksia, keuhkosairauksia, multippeliskleroosia, Alzheimerin tautia ja joitakin syöpiä (Klebanoff, 2005; Koelsch ym., 2010). Hapettimien haitallisia vaikutuksia on yritetty ehkäistä muun muassa antioksidanteilla ja poistamalla vetyperoksidia kudoksista. Keinot ovat osoittautuneet tehottomiksi, sillä esimerkiksi vetyperoksidia muodostuu monissa solun reaktioissa. MPO:n inhibitio saattaisi sen sijaan olla toimivampi lähestymistapa ja juuri parasetamolia onkin ehdotettu MPO:n inhibiittoriksi näissä sairauksissa (Koelsch ym., 2010). Parasetamolin aiheuttama MPO:n inhibitio ei välttämättä olisikaan pelkästään immuunipuolustusta heikentävä, vaan siitä voisi olla hyötyä edellä mainittujen sairauksien hoidossa (Koelsch ym., 2010).

MPO:n merkitsevyys immuunipuolustukselle on ollut kiistanalainen aihe, josta on tutkimustuloksia sekä puolesta että vastaan. MPO:n puute on saattanut altistaa hiiren tai ihmisen esimerkiksi vain joillekin tietyille patogeneille, tai MPO:n puuttuminen on heikentänyt immuunipuolustuksen toimintaa vain vähän (Prokopowicz ym., 2012). Kroonisesta granulomatoottisesta taudista kärsivillä toimimaton entsyymi on taas superoksidia tuottava NADPH-oksidaasi (Dahlgren ja Karlsson, 1999), joten sairaus ei liity suoraan MPO:n toimintaan. Prokopowicz ym. (2012) ovatkin sitä mieltä, että MPO osallistuu mikrobien tappamiseen, mutta se ei ole neutrofiilien tappo-ominaisuudelle välttämätön. Koska MPO on kuitenkin haitallisista ominaisuuksistaan huolimatta säilynyt evoluutiossa, olisi sillä oltava jokin tärkeä tehtävä elimistölle. He ehdottavatkin, että MPO toimisi jonkinlaisena kytkimenä, kun luonnollinen immuunivaste muuttuu opituksi, ja että se myös toimisi immuunipuolustuksen säätelijänä esimerkiksi tappamalla T-soluja.

2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Hengitysryöpsähdyksessä (engl. *respiratory burst*) neutrofiili tuottaa bakterisidisiä hapen reaktiivisia yhdisteitä tappaakseen kohtaamansa mikrobin. MPO on peroksidaasi, joka muuttaa neutrofiilin hengitysryöpsähdyksessä muodostuvaa vetyperoksidia muiksi mikrobeille myrkyllisiksi yhdisteiksi, kuten HOCl:ksi (Allen ym., 1972). Osa hengitysryöpsähdyksessä muodostuvista happiyhdisteistä on energialtaan virittyneessä tilassa ja palatessaan energian normaalitasolle tuottaa valoa. Tätä tuottuvaa valoa kutsutaan neutrofiilien KL:ksi (Allen ym., 1972) ja sitä voidaan vahvistaa erilaisilla yhdisteillä, kuten esimerkiksi luminolilla (Lilius ja Marnila, 1992). Luminolin tuottama valo on pääosin MPO:n toiminnasta peräisin, kun mittauksia tehdään neutrofiileillä (Cohen ym., 1983).

Luminoli hapettuu korkeaenergiseksi ioniksi myös silloin, kun eristetty MPO reagoi vetyperoksidin kanssa. Tällöin reaktiosta vapautuva valo on suoraan verrannollinen MPO:n aktiivisuuteen, eli esimerkiksi sen tuottaman HOCl:n määrään (Koelsch ym., 2010). Luminolia käyttämällä voidaan siten tutkia MPO:n inhiboitumista eri tekijöiden vaikutuksesta (Davies ja Edwards 1989). Toisaalta luminolivahvisteinen KL kertoo immuunipuolustuksen kyvystä tappaa mikrobeja, sillä MPO:n toiminta on oleellinen neutrofiilien hengitysryöpsähdykselle. KL-mittauksilla onkin tutkittu useiden sairauksien ja lääkeaineiden vaikutuksia immuunipuolustukseen (Shalabi ja al-Tuwaijri, 1996).

Vaikka neutrofiilien ja eristetyn MPO:n KL onkin mitta bakterisidisten yhdisteiden muodostumiselle, ei se anna suoraa tietoa niiden kyvystä tappaa bakteereja. Tämän vuoksi Atosuo ja Lilius (2011) käyttivät MPO:n ja neutrofiilien tappokyvyn mittaamiseksi bioluminesoivaa *E. coli-lux* bakteeria, jonka tuottama luminesenssi on suoraan verrannollinen reaktiossa olevien bakteerien määrään. BL-signaalia mittaamalla voidaan tapporeaktion etenemistä seurata reaaliajassa, eikä reaktiosta tarvitse tehdä maljauksia elävien bakteerien osuuden selvittämiseksi.

Parasetamoli, joka on suosittu kivun ja kuumeen lievitykseen tarkoitettu lääke, lisää MPO:n HOCl:n tuottoa pieninä pitoisuuksina ja vähentää suuremmilla (Koelsch ym., 2010). Se inhiboi neutrofiilien KL-vastetta kaikilla pitoisuuksilla (Shalabi ja al-Tuwaijri,

1996; Koelsch ym., 2010), joten sillä saattaa olla immuunipuolustusta heikentäviä vaikutuksia (Shalabi ja al-Tuwaijri, 1996). Parasetamolien suoranaista vaikutusta MPO:n bakteeritappoon ei ole kuitenkaan aiemmin tutkittu. MPO:n KL:ää mitattaessa reaktiosta emittoituvaa valoa ei myöskään ole tutkimuksissa mitattu yhtäjaksoisesti, vaan mittaukset on tehty aina tietyn inkubaatioajan jälkeen.

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, miten parasetamoli vaikuttaa MPO:n KL:ään ja bakteeritappoon. Kokeet tehtiin happamassa ja neutraalissa pH:ssa, sillä MPO:ta on neutrofiilien happamien fagolysosomien lisäksi myös solujen ulkopuolella (Allen ym., 1972; Lilius ja Nuutila, 2006).

Tutkimuksen kaksi päätavoitetta olivat:

- 1) Tutkia, mikä vaikutus parasetamolilla on MPO:n KL-vasteelle.
- 2) Tutkia, mikä vaikutus parasetamolilla on MPO:n kyvyllä tappaa bakteereja.

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1 Materiaalit

Liuosten valmistusohjeet ja niissä käytettyjen reagenssien tiedot ovat lopussa liitteenä (LIITE 1).

3.2 Menetelmät

3.2.1 *E. coli* -lux bakteerin kasvatusta ja varastointi

Tappokokeissa käytetty bakteeri oli rekombinantti *Escherichia coli* K-12 kanta, johon oli transformoitu *Photobacterium luminescens* -bakteerin lusiferaasi geeni (luxABCDE). Tämä *Escherichia coli* K-12 pEGFP_{lux}ABCDEAmp eli *E. coli* -lux tuottaa jatkuvasti valoa bioluminesenssilla, eikä tarvitse substraatin lisäystä valon tuottoon. Reaktiossa olevien *E. coli* -lux bakteerien määrä voidaan näin ollen suoraan päätellä reaktioseoksesta emittoituvasta valon määrästä (Atosuo ym., 2012).

E. coli -lux bakteerin 50 µl:n pakastetut varastoliuokset tehtiin Atosuo ym. 2012 -julkaisun mukaisesti. Tämän pakastetun liuoksen bakteerimäärä kymmenkertaistettiin seuraavasti: 50 µl pakastettua bakteeriliuosta lisättiin n. 120 ml:aan Luria Bertani Broth (LB) -liuosta. Bakteeriliuosta inkuboitettiin ravistelijassa +37 °C:ssa 4 tuntia, tai kunnes liuoksen OD_{620nm} oli 0,5 UV-1601 fotometrillä (Shimadzu). Bakteerisolut kerättiin sentrifugoimalla 10 min 3000 rpm ja pelletti resuspentoitiin 5 ml:aan LB-liuosta, joka sisälsi 25 % glyserolia. Tämän jälkeen resuspentoitu liuos jaettiin 25 µl:n eriksi, joita säilytettiin pakastimessa -80 °C:ssa. Bakteerien käsittelyssä käytetty LB-liuos sisälsi ampicilliinia 100 µg/ml. Janne Atosuo valmisti bakteerin varastoliuokset.

Kokeita varten pakastettu 25 µl:n liuos täytettiin aina 1 ml tilavuuteen puskurilla, jolloin bakteereja oli n. 4×10^7 bakteeria/ml. Bakteerien annettiin toipua puskurissa vähintään 30 minuuttia ennen kunkin kokeen aloitusta.

3.2.2 Reaktiot

KL-reaktiot ja bakteeritapon reaktiot tehtiin pH:ssa 7.0 ja 5.5 (Taulukko 1 ja 2). pH:ssa 7.0 MPO:n pitoisuus oli 1,3 nM ja pH:ssa 5.5 se oli 0,13 nM. Lisäksi KL-reaktiot toistettiin pH:ssa 7.0 MPO:n pitoisuudella 0,13 nM. Kokonaistilavuus oli kaikissa reaktioissa 250 µl ja ne käynnistettiin vetyperoksidin lisäyksellä.

Taulukko 1. KL-reaktioissa käytetyt reagenssit ja niiden pitoisuudet.

KL-REAKTIOT	
Reagenssi	Pitoisuus
MPO	1,3 nM tai 0,13 nM
Parasetamoli	0,15 µ-5000 µg/ml
H ₂ O ₂	167 µM
Luminoli	0,4 mM
HBSS (pH 7.0 tai 5.5)	x

Taulukko 2. Bakteeritapon reaktioissa käytetyt reagenssit ja niiden pitoisuudet.

BAKTEERITAPON REAKTIOT	
Reagenssi	Pitoisuus/Määrä
MPO	1,3 nM tai 0,13 nM
Parasetamoli	0,15-5000 µg/ml
H ₂ O ₂	167 µM
<i>E. coli</i> -lux bakteerit	n. 10 ⁶ kpl
HBSS (pH 7.0 tai 5.5)	x

3.2.3 Luminometri

Kaikki mittaukset tehtiin Plate Chameleon (Hidex) -luminometrillä +37 °C:ssa. Luminometrin käyttöohjelma oli MicroWin 2000 (Mikrotek). Reaktiot tehtiin 96-kuoppaisille levyille (Nunc) ja jokaisesta reaktioseoksesta tehtiin vähintään kaksi rinnakkaista mittausta.

3.2.4 Tulosten käsittely

Tulokset käsiteltiin Excelin versiolla 2007 (Microsoft) ja kuvaajat piirrettiin Originin versiolla 8 (Microcal).

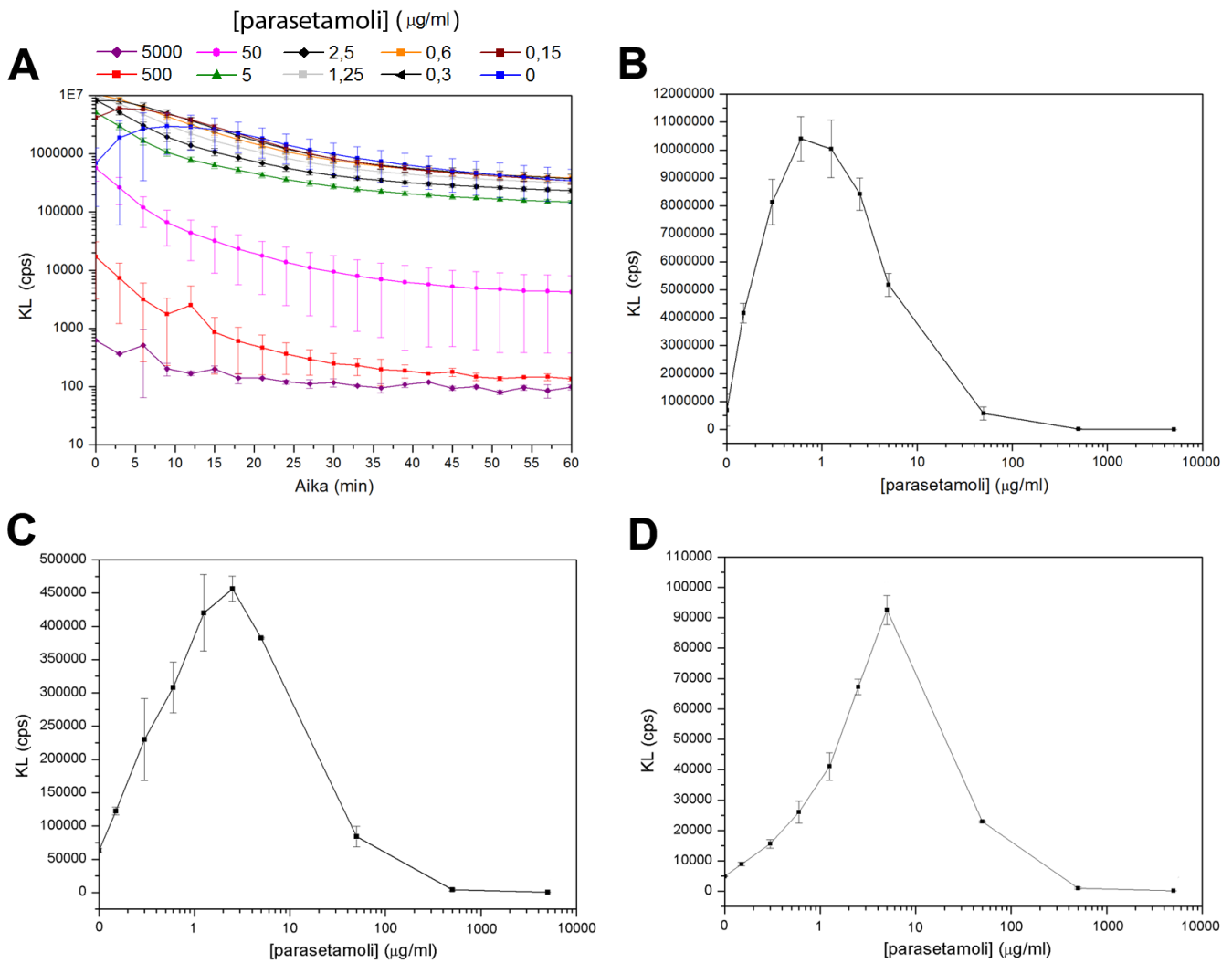
4 TULOKSET

4.1 Parasetamoli ja myeloperoksideasin kemiluminesenssivaste

MPO:n luminolivälitteinen KL-vaste (HOCl :n tuotto) mitattiin eri parasetamolipitoisuuksien kanssa. Parasetamoli sekä aktivoi että inhiboi MPO:n KL-vastetta pH:ssa 7.0 (Kuva 6 A ja B). Pienemmät pitoisuudet ($\leq 5 \mu\text{g/ml}$) kasvattivat vastetta ja suuremmat pitoisuudet ($\geq 50 \mu\text{g/ml}$) pienensivät. Parasetamolipitoisuus $0,6 \mu\text{g/ml}$ aiheutti suurimman aktivaation. Vasteen korkein arvo oli tällöin n. 10 000 000 cps, kun kontrollissa se oli ollut n. 700 000 cps. Suurimman inhibition aiheutti $5000 \mu\text{g/ml}$ pitoisuus, ja se pudotti vasteen n. 600 cps:ään.

Edelliset MPO:n KL-vasteen mittaukset toistettiin pH:ssa 5.5. Aktivaatio ja inhibitio näkyi myös tässä pH:ssa (Kuva 6 C), mutta kaikki vasteet olivat huomattavasti pienempiä kuin pH:ssa 7.0. Suurin aktivaatio saavutettiin $2,5 \mu\text{g/ml}$ parasetamolipitoisuudella, ja sillä MPO:n KL-vaste oli n. 450 000 cps, kun kontrollissa se oli ollut n. 60 000 cps. Pienin vaste saatiin $5000 \mu\text{g/ml}$ parasetamolipitoisuudella, ja aktivaatiota sekä inhibitiota tapahtui samoilla pitoisuuksilla kuin pH:ssa 7.0 ($\leq 5 \mu\text{g/ml}$ pitoisuudet nostivat vastetta ja $\geq 50 \mu\text{g/ml}$ pitoisuudet pienensivät).

MPO:n KL-reaktio pH:ssa 5.5 tehtiin myös MPO:n pitoisuudella $0,13 \text{ nM}$ (Kuva 6 D). Tämä oli sopiva pitoisuus MPO:n tapporeaktiolle alhaisessa pH:ssa, joten KL-reaktiot haluttiin vielä toistaa samoissa olosuhteissa. Vasteet olivat huomattavasti pienempiä kuin MPO pitoisuudella $1,3 \text{ nM}$ (Kuva 6 C). Suurin aktivaatio saavutettiin $5 \mu\text{g/ml}$ parasetamolipitoisuudella, ja sillä MPO:n KL-vaste oli n. 90 000 cps, kun kontrollissa se oli ollut n. 5000 cps. Tällä kertaa vaste oli kontrollia pienempi kuitenkin vain parasetamolipitoisuuksilla $500 \mu\text{g/ml}$ ja $5000 \mu\text{g/ml}$. pH:ssa 5.5 vasteet olivat kummallakin MPO:n pitoisuudella kinetiikaltaan samanlaisia kuin pH:ssa 7.0 (tuloksia ei esitetty).



Kuva 6. Parasetamolin vaikutus MPO:n luminolivälitteiseen KL-vasteeseen. Kuvaajissa kaikki pisteet ovat kahden rinnakkaisen reaktion keskiarvoja.

(A) MPO:n KL-vaste eri parasetamolipitoisuuksilla pH:ssa 7.0. Reaktiot sisälsivät MPO:ta (1,3 nM), luminolia (0,4 mM), vetyperoksidia (167 μM), parasetamolia (0,15- 5000 $\mu\text{g/ml}$) ja HBSS:ää.

(B) Annosvastekuvaaja kuvan (A) KL-arvoista ajanhetkellä 0 min.

(C) Annosvastekuvaaja MPO:n KL-vasteesta pH:ssa 5.5 ajanhetkellä 0 min. Reaktio sisälsi samat reagenssit ja pitoisuudet kuin reaktio (A).

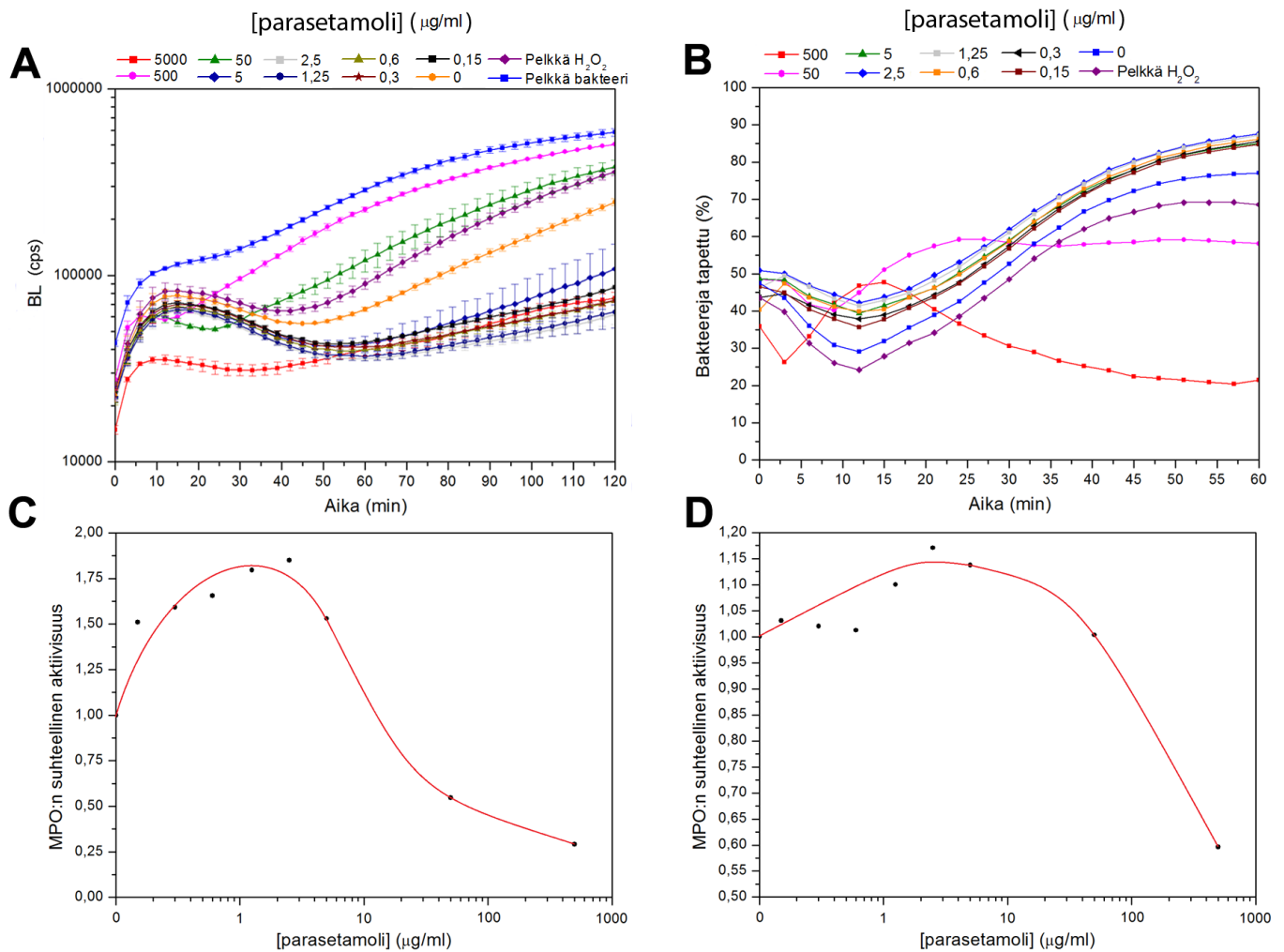
(D) Annosvastekuvaaja MPO:n KL-vasteesta pH:ssa 5.5 ajanhetkellä 0 min. Reaktio sisälsi samat reagenssit kuin reaktio (A), mutta MPO:n pitoisuus oli 0,13 nM.

4.2 Parasetamoli ja myeloperoksidaasin bakteeritappo

E. coli –lux bakteerin BL-vastetta mitattiin MPO:n ja eri parasetamolipitoisuuksien kanssa. MPO tappoi bakteereja huomattavasti enemmän kuin pelkkä vetyperoksidi (Kuva 7 A ja B). Neutraalissa pH:ssa parasetamoli myös edisti MPO:n bakteeritappoa pienillä pitoisuuksilla ja inhiboi suurilla (Kuva 7 A, B ja C). Parasetamolipitoisuus 5000 µg/ml häytti bakteerien kasvua jo itsessään, sillä tällä pitoisuudella bakteerien määrä oli poikkeuksellisesti kontrollia alempi (Kuva 7 A).

Pitoisuudet, joilla aktivaatiota ja inhibitiota tapahtui, olivat samat kuin MPO:n KL-reaktioissa (≤ 5 µg/ml edistivät tappoa ja ≥ 50 µg/ml vähensivät). Suurin aktivaatio saatiin pitoisuudella 2,5 µg/ml, jolloin bakteereja kuoli 10 % kontrollia enemmän. Toisaalta kontrollissa on 60 minuutin jälkeen ollut 23 % bakteereja jäljellä (77 % tappo) ja parasetamolin aiheuttama suurin aktivaatio on vähentänyt bakteerien määrän 12 %:iin (88 % tappo). Näin ollen pelkästä parasetamolin vaikutuksesta jäljellä olevien bakteerien määrä on puolittunut.

Happamassa pH:ssa parasetamolin aiheuttamaa aktivaatiota ei saatu näkyviin MPO:n pitoisuudella 1,3 nM, koska MPO toimii tehokkaammin alhaisessa pH:ssa työssä käytetyillä reagenssien pitoisuuksilla. Tämän vuoksi alhaisessa pH:ssa käytettiin MPO:n pitoisuutta 0,13 nM. Tällöin aktivaatio saatiin näkyviin samalla parasetamolipitoisuudella (2,5 µg/ml) kuin neutraalissa pH:ssa, mutta se ei ollut yhtä voimakasta (Kuva 7 D). Lisäksi inhiboituminen oli heikompaa ja se näkyi vasta 50 µg/ml ja 500 µg/ml parasetamolipitoisuuksilla.



Kuva 7. Parasetamolien vaikutus MPO:n tapporeaktioon. Kuvaajissa kaikki pisteet ovat kahden rinnakkaisen reaktion keskiarvoja.

(A) *E. coli* -lux bakteerien BL-vaste pH:ssa 7.0. Reaktiot sisälsivät MPO:ta (1,3 nM), *E. coli* -lux bakteereja (n. 10^6 kpl), vetyperoksidia (167 μ M), parasetamolia (0,15-5000 μ g/ml) ja HBSS:ää. Bakteerikontrolli (Pelkkä bakteeri) sisälsi vain bakteereja (n. 10^6 kpl) ja puskuria. Vetyperoksidikontrolli (Pelkkä H₂O₂) sisälsi bakteereja (n. 10^6 kpl), vetyperoksidia (167 μ M) ja puskuria.

(B) Kuvan (A) reaktiot MPO:n tappamien bakteerien osuutena esitettyinä. Prosenttiosuudet joka aikapisteessä laskettiin vertaamalla reaktioiden luminesenssiarvoja bakteerikontrolliin (sisälsi vain bakteerit ja puskuria). Parasetamolipitoisuus 5000 μ g/ml on jätetty kuvaajasta pois, sillä se haittasi jo itsessään bakteerien kasvua.

(C) MPO:n suhteellinen aktiivisuus kuvaajasta (B) ajanhetkellä 60 min. Suhteellinen aktiivisuus sai arvon 1,00 parasetamolipitoisuudella 0 μ g/ml, johon muita arvoja verrattiin.

(D) MPO:n suhteellinen aktiivisuus pH:ssa 5.5 ajanhetkellä 60 min. Reaktiot sisälsivät samat reagenssit kuin (A), mutta MPO:n pitoisuus oli 0,13 nM. Suhteellinen aktiivisuus sai arvon 1,00 parasetamolipitoisuudella 0 μ g/ml, johon muita arvoja verrattiin.

5 TULOSTEN TARKASTELU

5.1 Parasetamoli ja myeloperoksideasin kemiluminesenssivaste

Parasetamoli aktivoi MPO:n KL-vastetta pienillä pitoisuuksilla ja inhiboi suuremmilla reaktion alussa (Kuva 6 A–D). Koelsch ym. (2010) havaitsivat, että kun MPO:n HOCl:n tuotto mitataan 5 min reaktion aloituksen jälkeen, sen määrä on tavallista suurempi 5 µg/ml parasetamolipitoisuudella ja pienempi suuremmilla parasetamolipitoisuuksilla. Tämän työn MPO:n KL-mittauksissa suurin luminesenssin aktivaatio saatiin 0,6–5 µg/ml parasetamolipitoisuuksilla, joten Koelsch ym. (2010) tekemät havainnot tukevat tämän työn tuloksia.

Lisäksi Koelsch ym. (2010) mittasivat HOCl:n määrän 30 min reaktion käynnistyksen jälkeen 5 µg/ml parasetamolipitoisuudella, jolloin HOCl:n määrä olikin kontrollia alempi. Toisin sanoen, parasetamolin vaikutus HOCl:n tuotolle riippuu lääkeaineen pitoisuudesta ja siitä, kuinka kauan reaktion käynnistyksestä on kulunut. Sopivalla pitoisuudella parasetamoli lisää HOCl:n tuottoa vain reaktion alussa ja myöhemmin sen vaikutus on päinvastainen, eli se vähentää HOCl:n tuottoa (Koelsch ym., 2010). Tämä ilmiö näkyy myös kuvassa 6 A, jossa kontrollireaktion (sininen käyrä) KL alkaa mittauksen alussa vasta nousta, kun useimmissa parasetamolia sisältävissä reaktioissa se on lähtenyt korkeammalta ja on laskemaan päin. Parasetamoli lisäsi HOCl:n tuottoa normaaliannoksilla ensimmäisen 15 minuutin aikana, jonka jälkeen HOCl:n tuotto laski kontrollireaktion tason alapuolelle.

Annosvastekuvaajissa käytettiin hetken 0 min arvoja, joten parasetamolin aiheuttama aktivaatio näkyy niissä vielä voimakkaana. Parasetamoli nosti KL-vasteen sekä neutraalissa että happamassa pH:ssa kymmenen kertaa kontrollitasoa korkeammaksi. Lisäksi neutraalissa pH:ssa vasteet olivat kaikilla parasetamolipitoisuuksilla huomattavasti korkeampia kuin happamassa, mikä on voinut johtua siitä, että luminoli toimii voimakkaimmin korkeassa pH:ssa. pH:ssa 5.5 alempi MPO:n pitoisuus tuotti myös huomattavasti alempia vasteita kaikilla parasetamolipitoisuuksilla. Koelsch ym. (2010)

tekemässä tutkimuksessa 5 µg/ml parasetamolia aktivoi HOCl:n tuoton vain noin kaksinkertaiseksi, mutta tämä mitattiin vasta 5 min reaktion aloituksen jälkeen. Aktivaatio on voinut olla voimakkaampaa ennen mittausta.

MPO:n KL-mittauksissa osalle annosvastekuvaajien pisteistä saatiin tilastollisesti merkittävä ero kontrolliin verrattuna. Tämä laskettiin parillisella t-testillä. Tilastolliset merkinnät jätettiin kuvaajista kuitenkin pois, sillä eroja ei saatu kaikille pisteille. Tämä on voinut johtua siitä, että rinnakkaisia reaktioita oli vain kaksi ja joissakin keskiarvoissa keskihajonta oli melko suurta. Kokeet olisi voinut toistaa vielä siten, että rinnakkaisia reaktioita olisi ollut useampia.

5.2 Parasetamoli ja myeloperoksidaasin bakteeritappo

Optimi pH MPO:n toiminnalle riippuu reaktiossa olevan vetyperoksidin ja kloridi-ionien pitoisuuksien suhteesta (Zgliczynski ym., 1977). Tässä työssä käytettiin huomattavasti pienempää MPO:n pitoisuutta happamassa pH:ssa, eikä vetyperoksidin ja kloridi-ionien pitoisuuksia muutettu. Näin reaktio saatiin optimoitua sellaiseksi, että bakteereja jäi MPO:n kontrollireaktiossa tarpeeksi jäljelle parasetamolien aiheuttaman aktivaation varalle.

Bakteeritapon reaktioiden tulokset muistuttivat hyvin paljon KL-reaktioiden tuloksia. Neutraalissa pH:ssa parasetamoli edisti MPO:n bakteeritappoa pienillä pitoisuuksilla ja inhiboi suurilla, mikä vastasi KL-kokeissa saatuja tuloksia reaktion alussa (Kuva 7 A, B ja C). Jopa pitoisuudet, joilla tappo edistyi tai inhiboitui olivat samat. Nämä tulokset tukevat ajatusta, että MPO:n KL on sitä suurempi, mitä enemmän bakteereille myrkyllistä HOCl:ää muodostuu, sillä kaikkein korkeimman KL-vasteen tuottaneella parasetamolipitoisuudella on myös bakteereja kuollut eniten.

Toisaalta parasetamolien aiheuttamalla suurimmalla aktivaatiolla bakteereja kuoli vain 10 % enemmän kuin kontrollissa, joten aktivaatio ei vaikuttanut yhtä voimakkaalta kuin KL-reaktioissa. Lisäksi KL-mittausten perusteella parasetamolien kokonaisvaikutus HOCl:n muodostumiselle pitäisi olla inhiboiva (15 min jälkeen). Bakteeritapon reaktioissa osa parasetamolipitoisuuksista on kuitenkin edistänyt tappoa vielä 60 minuutin kohdalla.

Toisaalta tämä voisi johtua esimerkiksi siitä, että 15 minuutin aktivaatio on romahduttanut bakteerien määrän riittävän alhaiseksi, etteivät bakteerit ole enää 60 minuutin aikana ehtineet toipua normaalille tasolle.

Happamassa pH:ssa parasetamolin vaikutus MPO:n bakteeritappoon oli heikompaa kuin neutraalissa (Kuva 7 D). Koelsch ym. (2010) mukaan MPO:n affiniteetti kloridi-ioneihin kasvaa happamissa olosuhteissa, jolloin se myös muodostaa HOCl:ää enemmän. Tämä puolestaan johtaa siihen, että parasetamolin inhiboivan vaikutuksen tulisi olla vähäisempää alhaisessa pH:ssa. Bakteeritapon reaktioissa inhibitio näyttääkin olevan huomattavasti heikompaa ainakin 50 µg/ml parasetamolipitoisuudella. Tämän lisäksi on kuitenkin myös aktivaatio jostakin syystä heikentynyt. KL-reaktioissa inhibitio näyttää myös heikentyneen jonkin verran happamassa pH:ssa, mutta näissä reaktioissa pH:n muutos on saattanut vaikuttaa luminolin toimintaan (Kuva 6 B, C ja D).

5.3 Loppupohdinta

Uutta tässä työssä oli MPO:n KL-vasteen mittaaminen eri parasetamolipitoisuuksien kanssa yhtäjaksoisesti, sillä edellisissä tutkimuksissa KL tai HOCl:n määrä on mitattu aina tietyn inkubaatioajan jälkeen (Shalabi, 1992; Shalabi ja al-Tuwaijri, 1996; Koelsch ym., 2010). MPO:n bakteeritapon reaktion seuraaminen eri parasetamolipitoisuuksilla oli myös uutta.

Veressä vapaana olevan MPO:n osuudesta eri sairauksiin on ollut paljon puhetta (Nicholls ja Hazen, 2005; Koelsch ym., 2010; Shao ym., 2012). Tämän työn KL-mittausten tulosten perusteella parasetamolin kokonaisvaikutus HOCl:n tuottoon on inhiboiva (15 min jälkeen). Jos keskitytään vain niihin tutkimuksiin, joissa MPO on todettu elimistölle haitalliseksi (Nicholls ja Hazen, 2005; Koelsch ym., 2010; Shao ym., 2012) ja sen merkitys immuunipuolustukselle vähäiseksi (Prokopowicz ym., 2012), voisi sen inhibitiolla olla hyvin positiivisia vaikutuksia. Tämän työn KL-mittauksen tulokset tukisivat tätä ajatusta. Toisaalta bakteeritapon tulokset tässä työssä eivät kulje täysin käsi kädessä KL-mittausten tulosten kanssa, sillä inhibitiota ei näy näissä reaktioissa kuin yliannoksen pitoisuuksilla (\leq

150 μM tai $\leq 22,5 \mu\text{g/ml}$). Vallitseva ajatus kirjallisuuden mukaan on kuitenkin se, että parasetamoli inhiboi MPO:n toimintaa (Koelsch ym., 2010).

Toisaalta on myös vaikea kuvitella, minkälaisia vaikutuksia voimakkaalla 15 minuutin (tai MPO:n tappokokeiden perusteella pidempikestoisella ja heikommalla) aktivaatiolla voisi olla veressä vapaana olevalle MPO:lle koko elimistössä. Aktivaation vaikutuksia eivät ainakaan Koelsch ym. (2010) sen enempää pohdiskele, vaikka he ovat sen myös havainneet. Ehkä aktivaation vaikutuksia pidetään vähäisinä. Joka tapauksessa, MPO:n aktivaation ja inhibition vaikutukset elimistölle riippuvat todennäköisesti vapaan MPO:n määrästä, joka on myös ollut kiistanalainen aihe tutkijoiden keskuudessa. Kun otetaan huomioon vielä MPO:n eri muodot (inaktiivinen, aktiivinen), monimutkaistuu kuvio edelleen.

Muiden yhdisteiden vaikutuksia MPO:hon ja neutrofiileihin on jonkin verran jo tutkittu (Koelsch ym., 2010). Jotkin kipulääkkeet, tryptofaani ja sen johdannaiset sekä typpioksidin radikaalit inhiboivat ainakin eristetyn MPO:n HOCl:n muodostamista. Useat näistä yhdisteistä eivät kuitenkaan vaikuta kokonaisten neutrofiilien HOCl:n muodostumiseen (Koelsch ym., 2010). Koelsch ym. (2010) ovatkin sitä mieltä, että parasetamoli voisi olla paras vaihtoehto MPO:n inhibiittoriksi sairauksissa, joissa MPO:ta pidetään haitallisena. Parasetamolien käyttöä he perustelevat muun muassa sillä, että se inhiboi myös kokonaisten neutrofiilien HOCl:n tuottoa, solun ulkoinen väliaine ei haittaa sen toimintaa, ja sen käyttö ihmisissä on jo valmiiksi hyväksytty.

Tämän tutkimuksen kokeita olisi voinut vielä jatkaa esimerkiksi mittaamalla kokonaisten neutrofiilien KL-vastetta ja bakteeritappoa. Näin voitaisiin saada realistisempi kuva parasetamolien vaikutuksista immuunipuolustukseen, sillä kokeet, joissa käytetään vain eristettyä entsyymiä, ovat kuitenkin hyvin kaukana elimistön oikeasta tilanteesta. Näin saataisiin myös paremmin selville vaikuttaako parasetamoli samalla tavalla solujen ulkopuoliseen ja neutrofiilien sisällä olevaan MPO:hon. Samat kokeet voisi myös toistaa muilla lääkeaineilla, kuten aspiriinilla ja ibuprofeenilla, jotta tiedettäisiin, ovatko havaitut vaikutukset ominaisia vain parasetamolille. Näissä kokeissa olisi voinut myös suoraan

mitata HOCl:n määrää, kuten Koelsch ym., 2010 tekivät. KL:ää pidetään kuitenkin melko epäspesifisenä reaktiivisten happiyhdisteiden muodostumisen mittana.

Tämän tutkimuksen KL-mittausten ja bakteeritapon mittausten perusteella parasetamoli vaikuttaa MPO:n toimintaan merkittävästi lääkärin ohjeiden mukaan saavutettavilla pitoisuuksilla (alle 4 g annos vuorokaudessa, pitoisuus plasmassa pysyy alle 150 μM tai 22,5 $\mu\text{g/ml}$). Lisäksi parasetamoli vaikuttaa MPO:hon neutraalissa ja happamassa pH:ssa samalla tavalla, sillä kummissakin olosuhteissa oli havaittavissa aktivaatiota ja inhibitiota sekä KL:n että bakteeritapon reaktioissa. Näin ollen vaikuttaisi siltä, että parasetamolin vaikutus sekä solun sisäiseen että ulkopuoliseen MPO:hon olisi samanlaista. Voimakkuudeltaan vaikutus saattaa olla hieman heikompaa neutrofiilien sisällä olevalle MPO:lle. Bakteeritapon tulosten perusteella parasetamolin normaalikäytöllä saavutettavilla pitoisuuksilla (enintään 4 g vuorokaudessa) ei olisi ainakaan negatiivista vaikutusta MPO:n bakteeritapolle. Koska KL-mittauksissa parasetamolin vaikutus oli kuitenkin merkittävä, olisi tärkeää selvittää, mikä vaikutus parasetamolin inhibitiolla ja mahdollisella aktivaatiolla voisi olla ihmisen elimistön toiminnalle.

LÄHDELUETTELO

- Abramson, S.B., B. Cherksey, D. Gude, J. Leszczynska-Piziak, M.R. Philips, L. Blau ja G. Weissmann. 1990. Nonsteroidal antiinflammatory drugs exert differential effects on neutrophil function and plasma membrane viscosity. Studies in human neutrophils and liposomes. *Inflammation*. 14:11-30.
- Allen, R.C., R.L. Stjernholm ja R.H. Steele. 1972. Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. *Biochem.Biophys.Res.Communic.* 47:679-684.
- Amulic, B., C. Cazalet, G.L. Hayes, K.D. Metzler ja A. Zychlinsky. 2012. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu.Rev.Immunol.* 30:459-489.
- Atosuo, J., J. Lehtinen, L. Vojtek ja E.M. Lilius. 2012. Escherichia coli K-12 (pEGFP_{lux}ABCDEamp): a tool for analysis of bacterial killing by antibacterial agents and human complement activities on a real-time basis. *Luminescence*.
- Benbarek, H., A. Ayad, G. Deby-Dupont, L. Boukraa ja D. Serteyn. 2012. Modulatory effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of equine neutrophils. *Vet.Res.Communic.* 36:29-33.
- Bisaglia, M., V. Venezia, P. Piccioli, S. Stanzione, C. Porcile, C. Russo, F. Mancini, C. Milanese ja G. Schettini. 2002. Acetaminophen protects hippocampal neurons and PC12 cultures from amyloid beta-peptides induced oxidative stress and reduces NF-kappaB activation. *Neurochem.Int.* 41:43-54.
- Blough, E.R. ja M. Wu. 2011. Acetaminophen: beyond pain and Fever-relieving. *Front.Pharmacol.* 2:72.
- Boutaud, O., D.M. Aronoff, J.H. Richardson, L.J. Marnett ja J.A. Oates. 2002. Determinants of the cellular specificity of acetaminophen as an inhibitor of prostaglandin H(2) synthases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99:7130-7135.
- Bower, W.A., M. Johns, H.S. Margolis, I.T. Williams ja B.P. Bell. 2007. Population-based surveillance for acute liver failure. *Am.J.Gastroenterol.* 102:2459-2463.
- Bronstein, A.C., D.A. Spyker, L.R. Cantilena Jr, J. Green, B.H. Rumack ja S.E. Heard. 2007. 2006 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS). *Clin.Toxicol.(Phila).* 45:815-917.
- Burke, A., E.M. Smyth ja G.A. Fitzgerald. 2006. Analgesic-antipyretic agents: pharmacotherapy of gout. Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th ed. McGraw-Hill. New York.
- Camitta, B.M. ja R.J. Slye. 2012. Optimizing use of the complete blood count (Optymalne stosowanie badania morfologicznego krwi). *Pediatra Polska.* 87:72-77.
- Cassatella, M.A., M. Locati ja A. Mantovani. 2009. Never underestimate the power of a neutrophil. *Immunity.* 31:698-700.
- Catella-Lawson, F., M.P. Reilly, S.C. Kapoor, A.J. Cucchiara, S. DeMarco, B. Tournier, S.N. Vyas ja G.A. Fitzgerald. 2001. Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N.Engl.J.Med.* 345:1809-1817.
- CCM International. 2011. Survey of PAP and paracetamol in Asia Pacific. Tiivistelmä raportista: www.cnchemicals.com: Market reports. Luettu 27.11.2012.

- Cohen, M.S., P.S. Shirley ja L.R. DeChatelet. 1983. Further evaluation of luminol-enhanced luminescence in the diagnosis of disorders of leukocyte oxidative metabolism: role of myeloperoxidase. *Clin.Chem.* 29:513-515.
- Cover, C., J. Liu, A. Farhood, E. Malle, M.P. Waalkes, M.L. Bajt ja H. Jaeschke. 2006. Pathophysiological role of the acute inflammatory response during acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 216:98-107.
- Dahlgren, C. ja A. Karlsson. 1999. Respiratory burst in human neutrophils. *J.Immunol.Methods.* 232:3-14.
- Davies, B. ja W. Edwards. 1989. Inhibition of myeloperoxidase by salicylhydroxamic acid. *Biochem. J.* 258:801-806.
- Diaz-Rodriguez, L., O. Garcia-Martinez, M. Arroyo-Morales, B. Rubio-Ruiz ja C. Ruiz. 2010. Effect of acetaminophen (paracetamol) on human osteosarcoma cell line MG63. *Acta Pharmacol.Sin.* 31:1495-1499.
- Eerola, L. 2005. Pro gradu –tutkielma: Neutrofiilien granulat & neutrofiilien sitoutuminen, ingestio ja degranulaatio fagosytoosissa.
- Evans, C.E. ja C. Butcher. 2004. The influence on human osteoblasts in vitro of non-steroidal anti-inflammatory drugs which act on different cyclooxygenase enzymes. *J.Bone Joint Surg.Br.* 86:444-449.
- Faurschou, M. ja N. Borregaard. 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 5:1317-1327.
- Fernandes, R.M., N.P. da Silva ja E.I. Sato. 2012. Increased myeloperoxidase plasma levels in rheumatoid arthritis. *Rheumatol.Int.* 32:1605-1609.
- Garavito, R.M. ja D.L. DeWitt. 1999. The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim.Biophys.Acta.* 1441:278-287.
- Graham, G.G., R.O. Day, M.K. Milligan, J.B. Ziegler ja A.J. Kettle. 1999. Current concepts of the actions of paracetamol (acetaminophen) and NSAIDs. *Inflammopharmacology.* 7:255-263.
- Graham, G.G. ja K.F. Scott. 2005. Mechanism of action of paracetamol. *Am.J.Ther.* 12:46-55.
- Heading, R.C., J. Nimmo, L.F. Prescott ja P. Tothill. 1973. The dependence of paracetamol absorption on the rate of gastric emptying. *Br.J.Pharmacol.* 47:415-421.
- Hedman, K., T. Heikkinen, P. Huovinen, A. Järvinen, S. Meri ja M. Vaara. 2011. Immunologia – mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 2. Duodecim. Helsinki.
- Herschman, H.R. 1996. Prostaglandin synthase 2. *Biochim.Biophys.Acta.* 1299:125-140.
- Hinz, B. ja K. Brune. 2012. Paracetamol and cyclooxygenase inhibition: is there a cause for concern? *Ann.Rheum.Dis.* 71:20-25.
- Hinz, B., O. Cheremina ja K. Brune. 2008. Acetaminophen (paracetamol) is a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in man. *FASEB J.* 22:383-390.
- Ishida, Y., T. Kondo, A. Kimura, K. Tsuneyama, T. Takayasu ja N. Mukaida. 2006. Opposite roles of neutrophils and macrophages in the pathogenesis of acetaminophen-induced acute liver injury. *Eur.J.Immunol.* 36:1028-1038.
- Jaeschke, H. 2006. How relevant are neutrophils for acetaminophen hepatotoxicity? *Hepatology.* 43:1191-1194.

- Jaeschke, H. ja M.L. Bajt. 2006. Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicol.Sci.* 89:31-41.
- Jaeschke, H. ja J. Liu. 2007. Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity: another perspective. *Hepatology.* 45:1588-9; author reply 1589.
- Jaeschke, H., M.R. McGill ja A. Ramachandran. 2012. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab.Rev.* 44:88-106.
- James, L.P., S.S. McCullough, T.R. Knight, H. Jaeschke ja J.A. Hinson. 2003. Acetaminophen toxicity in mice lacking NADPH oxidase activity: role of peroxynitrite formation and mitochondrial oxidant stress. *Free Radic.Res.* 37:1289-1297.
- Jantschko, W., P. Georg Furtmuller, M. Zederbauer, M. Lanz, C. Jakopitsch ja C. Obinger. 2003. Direct conversion of ferrous myeloperoxidase to compound II by hydrogen peroxide: an anaerobic stopped-flow study. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 312:292-298.
- Jefferies, S., M. Saxena ja P. Young. 2012. Paracetamol in critical illness: a review. *Crit.Care.Resusc.* 14:74-80.
- Jenkins, C., J. Costello ja L. Hodge. 2004. Systematic review of prevalence of aspirin induced asthma and its implications for clinical practice. *BMJ.* 328:434.
- Kemp, A.S. ja M.W. Turner. 1986. The role of opsonins in vacuolar sealing and the ingestion of zymosan by human neutrophils. *Immunology.* 59:69-74.
- Klebanoff, S.J. 2005. Myeloperoxidase: friend and foe. *J.Leukoc.Biol.* 77:598-625.
- Koelsch, M., R. Mallak, G.G. Graham, T. Kajer, M.K. Milligan, L.Q. Nguyen, D.W. Newsham, J.S. Keh, A.J. Kettle, K.F. Scott, J.B. Ziegler, D.I. Pattison, S. Fu, C.L. Hawkins, M.D. Rees ja M.J. Davies. 2010. Acetaminophen (paracetamol) inhibits myeloperoxidase-catalyzed oxidant production and biological damage at therapeutically achievable concentrations. *Biochem.Pharmacol.* 79:1156-1164.
- Larson, A.M. 2007. Acetaminophen hepatotoxicity. *Clin.Liver Dis.* 11:525-48, vi.
- Lawson, J.A., A. Farhood, R.D. Hopper, M.L. Bajt ja H. Jaeschke. 2000. The hepatic inflammatory response after acetaminophen overdose: role of neutrophils. *Toxicol.Sci.* 54:509-516.
- Lilius, E.M. ja P. Marnila. 1992. Photon emission of phagocytes in relation to stress and disease. *Experientia.* 48:1082-1091.
- Lilius, E.M. ja J.T. Nuutila. 2006. Particle-induced myeloperoxidase release in serially diluted whole blood quantifies the number and the phagocytic activity of blood neutrophils and opsonization capacity of plasma. *Luminescence.* 21:148-158.
- Liu, Z.X., D. Han, B. Gunawan ja N. Kaplowitz. 2006. Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology.* 43:1220-1230.
- Loll, P.J., D. Picot, O. Ekabo ja R.M. Garavito. 1996. Synthesis and use of iodinated nonsteroidal antiinflammatory drug analogs as crystallographic probes of the prostaglandin H2 synthase cyclooxygenase active site. *Biochemistry.* 35:7330-7340.
- Maharaj, H., D.S. Maharaj ja S. Daya. 2006. Acetylsalicylic acid and acetaminophen protect against oxidative neurotoxicity. *Metab.Brain Dis.* 21:189-199.

- Main, P.A., M.T. Angley, C.E. O'Doherty, P. Thomas ja M. Fenech. 2012. The potential role of the antioxidant and detoxification properties of glutathione in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Nutr.Metab.(Lond)*. 9:35-7075-9-35.
- Marquez, L.A. ja H.B. Dunford. 1993. Interaction of acetaminophen with myeloperoxidase intermediates: optimum stimulation of enzyme activity. *Arch.Biochem.Biophys*. 305:414-420.
- McGill, M.R., H.M. Yan, A. Ramachandran, G.J. Murray, D.E. Rollins ja H. Jaeschke. 2011. HepaRG cells: a human model to study mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology*. 53:974-982.
- Merrill, G.F., T.H. Rork, N.M. Spiler ja R. Golfetti. 2004. Acetaminophen and myocardial infarction in dogs. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol*. 287:H1913-20.
- Miners, J.O., R.A. Robson ja D.J. Birkett. 1986. Paracetamol metabolism in pregnancy. *Br.J.Clin.Pharmacol*. 22:359-362.
- Mustajoki, P. ja J. Kaukua. 2008. Senkka ja 100 muuta tutkimusta. Duodecim. Helsinki.
- Nam, T.G., S.J. Nara, I. Zagol-Ikapitte, T. Cooper, L. Valgimigli, J.A. Oates, N.A. Porter, O. Boutaud ja D.A. Pratt. 2009. Pyridine and pyrimidine analogs of acetaminophen as inhibitors of lipid peroxidation and cyclooxygenase and lipoxygenase catalysis. *Org.Biomol.Chem*. 7:5103-5112.
- Nelson, S.D. 1990. Molecular mechanisms of the hepatotoxicity caused by acetaminophen. *Semin.Liver Dis*. 10:267-278.
- Nicholls, S.J. ja S.L. Hazen. 2005. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol*. 25:1102-1111.
- Nuutila, J.T. 2003. Väitöstyö: Interrelations between receptor expression, respiratory burst, and phagocytosis. Turun yliopisto. Turku.
- Nuutila, J.T. ja E.M. Lilius. 2005. Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. *Cytometry A*. 65A: 93-102.
- Ouellet, M. ja M.D. Percival. 2001. Mechanism of acetaminophen inhibition of cyclooxygenase isoforms. *Arch.Biochem.Biophys*. 387:273-280.
- Peskar, B.M. 1977. On the synthesis of prostaglandins by human gastric mucosa and its modification by drugs. *Biochim.Biophys.Acta*. 487:307-314.
- Prokopowicz, Z., J. Marcinkiewicz, D.R. Katz ja B.M. Chain. 2012. Neutrophil myeloperoxidase: soldier and statesman. *Arch.Immunol.Ther.Exp.(Warsz)*. 60:43-54.
- Ramaiah, S.K. ja H. Jaeschke. 2007. Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury. *Toxicol.Pathol*. 35:757-766.
- Scaffidi, P., T. Misteli ja M.E. Bianchi. 2002. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 418:191-195.
- Schilling, A., R. Corey, M. Leonard ja B. Eghtesad. 2010. Acetaminophen: old drug, new warnings. *Cleve.Clin.J.Med*. 77:19-27.
- Settipane, R.A., P.J. Schrank, R.A. Simon, D.A. Mathison, S.C. Christiansen ja D.D. Stevenson. 1995. Prevalence of cross-sensitivity with acetaminophen in aspirin-sensitive asthmatic subjects. *J.Allergy Clin.Immunol*. 96:480-485.

Shalabi, E.A. 1992. Acetaminophen inhibits the human polymorphonuclear leukocyte function in vitro. *Immunopharmacology*. 24:37-45.

Shalabi, E.A. ja A.S. al-Tuwaijri. 1996. The thermal potentiation of acetaminophen-inhibited PMN oxidative metabolism in vitro. *Biopharm. Drug Dispos.* 17:501-509.

Shao, B., S. Pennathur ja J.W. Heinecke. 2012. Myeloperoxidase targets apolipoprotein A-I, the major high density lipoprotein protein, for site-specific oxidation in human atherosclerotic lesions. *J.Biol.Chem.* 287:6375-6386.

Shertzer, H.G., S.N. Schneider, E.L. Kendig, D.J. Clegg, D.A. D'Alessio ja M.B. Genter. 2008. Acetaminophen normalizes glucose homeostasis in mouse models for diabetes. *Biochem.Pharmacol.* 75:1402-1410.

Thomas, E.L. 1979. Myeloperoxidase, hydrogen peroxide, chloride antimicrobial system: nitrogen-chlorine derivatives of bacterial components in bactericidal action against *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* 23:522-531.

Toes, M.J., A.L. Jones ja L. Prescott. 2005. Drug interactions with paracetamol. *Am.J.Ther.* 12:56-66.

van Zyl, J.M., K. Basson ja B.J. van der Walt. 1989. The inhibitory effect of acetaminophen on the myeloperoxidase-induced antimicrobial system of the polymorphonuclear leukocyte. *Biochem.Pharmacol.* 38:161-165.

Weiss, S.J., R. Klein, A. Slivka ja M. Wei. 1982. Chlorination of taurine by human neutrophils. Evidence for hypochlorous acid generation. *J.Clin.Invest.* 70:598-607.

Wu, M., D.H. Desai, S.K. Kakarla, A. Katta, S. Paturi, A.K. Gutta, K.M. Rice, E.M. Walker Jr ja E.R. Blough. 2009a. Acetaminophen prevents aging-associated hyperglycemia in aged rats: effect of aging-associated hyperactivation of p38-MAPK and ERK1/2. *Diabetes Metab.Res.Rev.* 25:279-286.

Wu, M., A. Katta, M.K. Gadde, H. Liu, S.K. Kakarla, J. Fannin, S. Paturi, R.K. Arvapalli, K.M. Rice, Y. Wang ja E.R. Blough. 2009b. Aging-associated dysfunction of Akt/protein kinase B: S-nitrosylation and acetaminophen intervention. *PLoS One*. 4:e6430.

Yohe, H.C., K.A. O'Hara, J.A. Hunt, T.J. Kitzmiller, S.G. Wood, J.L. Bement, W.J. Bement, J.G. Szakacs, S.A. Wrighton, J.M. Jacobs, V. Kostrubsky, P.R. Sinclair ja J.F. Sinclair. 2006. Involvement of Toll-like receptor 4 in acetaminophen hepatotoxicity. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 290:G1269-79.

Zgliczynski, J.M., R.J. Selvaraj, B.B. Paul, T. Stelmaszynska, P.K. Poskitt ja A.J. Sbarra. 1977. Chlorination by the myeloperoxidase-H₂O₂-Cl⁻ antimicrobial system at acid and neutral pH. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 154:418-422.

www-sivu: Suomen apteekkarilehden verkkosivusto www.apteekkari.fi. Uutiset: Parasetamolimykytykset lisääntyneet. Uutinen julkaistu 29.6.2012, päivitetty 30.6.2012, luettu 26.10.2012.

LIITTEET

Liite 1: Liuosten valmistusohjeet

Boraattipuskuri

Luminolin varastoliuoksen valmistuksessa käytetty 0,2 M boraattipuskuri (pH 9) sisälsi yhden osan 0,2 M boorihappoa (H_3BO_3) ja neljä osaa natriumtetraboraattia ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$).

HBSS -puskurit

Hankin tasapainotettu suolaliuos (HBSS) sisälsi litraa kohden 8 g NaCl; 0,4 g KCl; 0,048 g Na_2HPO_4 ; 0,35 g NaHCO_3 ; 0,06 g KH_2PO_4 ; 1 g glukoosi; 0,14 g CaCl_2 ; 0,1 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ja 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$.

HBSS -puskurien pH säädettiin H_3PO_4 :lla.

Kaikki puskurit valmistettiin MQ -veteen (Millipore, Ranska) ja niitä säilytettiin jääkaapissa $+4 \text{ }^\circ\text{C}$:ssa. Puskurien valmistuksessa käytetyt reagenssit olivat puhtaudeltaan vähintään analyyttistä puhtausluokkaa.

Luminoli

Luminolin (5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalatsiinidioni) 10 mM varastoliuos valmistettiin liuottamalla luminoli (Sigma-Aldrich) 0,2 M boraattipuskuriin. Luminoliliuos säilytettiin pakastimessa $-20 \text{ }^\circ\text{C}$:ssa.

Myeloperoksidaasi

MPO:n varastoliuos tehtiin liuottamalla ihmisen polymorfonukleaarisilta leukosyyteiltä eristetty MPO (Planta Natural Products) MQ -veteen 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pitoisuudeksi. Liuoksesta valmistettiin myös 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ laimennoksia. Varastoliuokset säilytettiin pakastimessa $-20 \text{ }^\circ\text{C}$:ssa.

Parasetamoli

Jauhemuotoinen parasetamoli (4'-hydroxyacetanilide, Sigma-Aldrich) liuotettiin koepäivänä puskuriiin yleensä noin 12000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pitoisuudeksi, jota laimennettiin edelleen tarpeen mukaan. Liuottimena käytettiin HBSS puskuria. Parasetamolijauhetta säilytettiin huoneenlämmössä.

Vetyperoksidi

Vetyperoksidista (30 % w/w, J.T. Baker) tehtiin 500 μl erinä pakastimeen $-20 \text{ }^\circ\text{C}$:seen. Alkuperäistä vetyperoksidia säilytettiin jääkaapissa $+4 \text{ }^\circ\text{C}$:ssa.