

УДК 612.112.91:616-053.2

Маслянко Р. П., д.б.н., професор;
Левківський Д.М., к.вет.н., доцент;
Божик Л.Я., к.вет.н., ст. викладач;
Левківська Н.Д., к.вет.н., доцент[©]

Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С. З. Гжицького

РОЛЬ ФАГОЦИТОЗУ В СИСТЕМІ ПРОТИІНФЕКЦІЙНОГО ЗАХИСТУ МАКРООРГАНІЗМУ

У роботі представлено сучасні дані про роль кисень залежних механізмів захисту макроорганізму, які здійснюються фагоцитуючими клітинами. Детально описано шляхи утворення реактивних метаболітів кисню в клітинах і ферментні системи, що беруть участь в їх напрацюванні. Охарактеризовано бактерицидні властивості реактивних метаболітів кисню та визначена їх роль як фізіологічних медіаторів при запальних процесах. Відмічені різниці в реалізації бактерицидної активності нейтрофільних гранулоцитів і макрофагів. Проаналізовано дані про роль фагоцитів у кооперації з іншими клітинами при інфекціях і наведено докази про здатність цих клітин до синтезу та виділення низькомолекулярних біологічно активних речовин.

Ключові слова: нейтрофільні гранулоцити, макрофаги, бактерицидна активність, реактивні метаболіти кисню.

Відкриття фагоцитозу як неспецифічного фактору протиінфекційного захисту людини і тварин належить нашому співвітчизнику І.І. Мечнікову, за що він у 1908 р. отримав Нобелівську премію. Геніальність І.І. Мечнікова полягає в тому, що він відкрив не лише прямі бактерицидні властивості цих клітин, але й також припустив інші можливі їх функції, як наприклад, «передача імунітету – за допомогою більших корпушкул через продукцію ними «секретинів» (цитокінів у сучасному розумінні). Нейтрофільні гранулоцити належать до короткоживучих клітин, але їм відводиться надзвичайно важлива роль у знищенні позаклітинних патогенів і їх токсинів, тоді як інша група фагоцитів – макрофаги – належать до довгоживучих клітин. У додаток до бактерицидної активності фагоцити здатні здійснювати ряд інших важливих функцій, таких як обмеження росту облігатних внутрішньоклітинних патогенів, продукція багатьох біологічно активних молекул, потрібних для регуляції різних функцій клітин (компоненти комплементу, простагландини та цитокіни), видалення дефектних клітин і ін. [5, 6].

Сьогодні вважається загальновизнаним те, що нейтрофіли і макрофаги беруть участь у захисті організму за допомогою ідентичного багатоступеневого процесу [19]. Первинна імунна відповідь на введення будь-якого патогену в

[©] Маслянко Р. П., Левківський Д.М., Божик Л.Я., Левківська Н.Д., 2013

організм здійснюється резистентними макрофагами, які продукують фактори запалення. Поряд з речовинами, що виділяються патогенними агентами, вони здійснюють хемотаксичний градієнт. В свою чергу, нейтрофіли відповідають на міжклітинні сигнали проходять через епітелій, при цьому їх слабка адгезія опосередкована лектиноподібними молекулами – селектинами. Ці фагоцити вже активовані для адгезії до ендотелію шляхом власних мембраних інтегринів і здатні розпізнати спеціальними рецепторами – серпентинами – специфічні хемоатрактанті. Одночасно з цим відбувається зміна форми клітини за допомогою перегрупування актинового цитоскелета.

За сучасними даними [3, 4], відомо два чітко відмінних функціональних стани фагоцитів: вихідний, так званий «redox», з низьким рівнем перебігу процесів, і активований, перехід до якого зумовлений взаємодією клітин з різними стимуляторами. При цьому, в процесі попередньої дії стимулів, в тому числі бактерій, посиленні міграції, адгезії, дегрануляції та метаболізму [23]. Це явище, починаючи з 1980 р., стосовно фагоцитів отримало назву праймінгу (priming), тобто підготовки, переведення клітин у робочий стан. Таким чином, нейтрофіли, досягнувши місце запалення, здатні розпізнати патоген або через мембраничні рецептори для опсонінів (фактори комплементу C3b та iC3b, а також Fc компонент імуноглобулінів), або через лектини мікробів і фагоцитів (опсонін-незалежний фагоцитоз). Потім починається процес фагоцитозу, який здійснюється за допомогою механізму, що діє як замок-бліскавка (з англ. zipper – тобто послідовного розпізнання патогенів псевдоподіями фагоцитів), відбувається захоплення, поглинання мікробів за допомогою інвагінації плазматичної мембрани клітин і утворення фагоцитарної вакуолі [26]. При цьому активуються дві функції фагоцитів: викидання вмісту гранул у фагосому та кисневий вибух.

Феномен кисневого вибуху вперше описаний у 1933 р. C. Baldridge і R. Gerard, його суть полягає в тому, що фагоцити різко збільшують споживання кисню – від 50 до 100 разів. Цей процес відбувається при стимуляції комплексу НАДФ-оксидази, відомої також як фагоцитарна оксидаза. Субклінічна локалізація цього комплексу добре вивчена в нейтрофільних гранулоцитах і його присутність відмічається також на мембрах азурофільних гранул. У макрофагах цей комплекс виявляється лише на плазматичній мембрані, оскільки складові цього комплексу не виявлено на мембрах гранул макрофагів. За даними окремих авторів [17], припускається, що ці клітини не здатні продукувати реактивні види кисню внутрішньофагоцитарно.

На послідовних реакціях утворення реактивних метаболітів кисню слід зупинитися окремо, тому що в останні роки було виявлено та описано нові складові НДФ-оксидазного комплексу. На першому етапі для утворення із молекули кисню супероксидного аніону O_2^- – донором електронів є НАДФ-оксидазний комплекс. У 1959 р. A. Sbarra і M. Karnovsky [25] було встановлено, що цей комплекс включає 4 білкових компоненти, молекулярні маси которых увійшли в їх назви – p40^{PHOX} (PHOX розшифровується як Phagocyte OXygenase – фагоцитарна оксидаза), відповідно, описано p47^{PHOX}, p67^{PHOX}, p22^{PHOX} і

глюкопротеїд gp91^{PHOX}. У клітинах в стані спокою «redox» у трьох із цих компонентів знаходиться в цитозолі у вигляді комплексу, а у інших локалізовані на плазматичній мембрані. Розподіл цих двох груп компонентів за їх локалізацією гарантує інактивацію оксидаз в «redox» фагоцитах [7]. При стимуляції клітин цитозольний компонент p47^{PHOX} фосфорилюється і виступає як адаптер зв'язку компонента p67^{PHOX} з цитохромом b558, а в свою чергу фосфорилювання p40^{PHOX} викликає конфірмаційні зміни p67^{PHOX} для повноцінного зв'язку з цитохромом [14]. Таким чином, зібраний НАДФ-оксидазний комплекс здатний до передачі електронів від субстрату до кисню за допомогою власних електрон-несучих протезних груп – флавінів, перетворюючись на відновлений НАДФ⁺-комплекс.

У літературі відмічаються різні шляхи регуляції НАДФ-оксидази нейтрофілів залежно від того, де вона локалізована: на плазматичній мембрані чи на мембрані гранул [16].

Продукт відновлення НАДФ-оксидазного комплексу супероксидний радикал – O₂⁻ є початковим матеріалом для продукції широкого ряду реактивних оксидантів, уключаючи окисні галогени, вільні радикали та синглетний кисень. Ці окислювачі використовуються для поглинення мікробів, але вони також викликають виражене руйнування оточуючих тканин, тому їх формування повинно бути відрегульованим.

Другим етапом є перетворення супероксидного аніону O₂⁻ у наступний потужний компонент перекис водню (H₂O₂) може відбутися спонтанно або каталізуватися супероксид-дисмутазою [1]. H₂O₂ сама по собі не є бактерицидною, але при високій концентрації може проявитися захисний ефект. Таким чином, як екзогенно утворений супероксид, так і H₂O₂ не здатні безпосередньо вбивати мікроби [18]. Більш вираженими за бактерицидною дією є інші реактивні метаболіти кисню, утворені з перекису водню. У фагоцитах є чотири потенційні механізми перетворення H₂O₂. Перший шлях здійснюється за допомогою реакції Фентона, вперше описана в 1894 р., за участю сульфату заліза. Її результатом є гідроксильний радикал –OH. При подальшому дослідженні в 1934 р. Хабер і Вейс виявили, що утворення гідроксильного радикалу в обмеженій концентрації двовалентних іонів заліза, як у випадку з біологічними рідинами (цитозоль фагоцитів) до перетворення тривалентного заліза у двовалентне, може підключатися супероксидний аніон. Ця реакція названа реакцією Хабер-Вейса.

Гідроксильні радикали виявляють пошкоджуючи дію на бактерії [13]. Вони здатні, діючи на SH-групи, гістидинові та інші амінокислотні складові білків, викликати їх денатурацію, таким чином, дезактивуючи ферменти. В окремих дослідах [17] виявлено, що гідроксильні радикали, вироблені системами, що включають хлориди, найбільш токсичні для бактерій.

Синглетний кисень (1O₂) також продукується нейтрофільними гранулоцитами при взаємодії гідроксильного радикалу з HOC1. Хоча спочатку припускали, що цей реактивний вид кисню був джерелом хемілюмінесценції стимулюваних клітин, подальші дослідження методом специфічного

інфрачервоного випромінювання не виявили продукції синглетного кисню нейтрофілами [21].

Недавно був названий ще один реактивний метаболіт кисню – продукт респіраторного вибуху в нейтрофілах озон (O_3) [8]. Його утворення було встановлено поряд з виникненням синглетного кисню за безпосередньою участі з мієлопероксидазно- H_2O_2 -хлоридної систем. Озон сам по собі є бактерицидним, але в комбінації з H_2O_2 він ще більше токсичний для мікроорганізмів.

В даний час активно досліджується ще один метаболіт – оксид азоту (NO). Він є вільним радикалом (газовою молекулою), який продукується із молекулярного кисню та гуанінового нітрогену L-аргініну, зібраного в L-цитруліні [22]. Було встановлено, що NO включається в неспецифічний імунітет і часткового до комплексного механізму тканинного походження як важливий медіатор запальних процесів і апоптозу. При цьому цитотоксичні/цитопатичні дії посилюються завдяки здатності NO вступати в реакцію з супероксидним радикалом, утворюючи пероксинітрат. Ця сполука володіє значно більшою реакційною здатністю, ніж NO або супероксидний радикал відокремлено [19].

За даними [11], система, що включає реактивні попередники азоту похідні індуцибельної нітроксидази (iNOS), існує не лише в нейтрофілах, але й в макрофагах.

У зрілих макрофагах замість ферменту мієлопероксидази існує інша альтернативна система руйнування H_2O_2 і інших форм активного кисню, що складається з каталази та глутатіонпероксидази. Серед класів макрофагів найбільш активно генерують супероксидний аніон, альвеолярні макрофаги, при цьому пряма залежність між споживанням кисню і мікробіцидною здатністю макрофагів визначається не завжди. Існує ще одна особливість цих клітин, яка визначає їх функціональну призначеність як ключових клітин запалення. У процесі дозрівання із моноцита в макрофаги в цих фагоцитах відмічається різке зниження внутрішньоклітинної кількості азурофільних гранул, які включають основний агресин бактерицидних ферментів: мієлопероксидазу, серинові протеази, катіонні білки та лактоферин. Дані органели рахуються істинними мікробіцидними органелами, що мобілізуються при фагоцитозі, що визначає роль цих клітин як своєрідних «камікадзе» збудників гострих інфекційних захворювань [29]. Слід зазначити, що в літературі часто при описаннях включень фагоцитів ототожнюють поняття «лізосоми» та «азурофільні гранули» [27]. Ці дві клітинні органелі за своїм змістом відрізняються одна від одної. Якщо для лізосом макрофагів характерна наявність таких компонентів: кислі гідролази, нейтральні протеази, наявність лізоциму, пероксидаз, то в азурофільних гранулах нейтрофілів додається мієлопероксидаза та катіонні бактерицидні білки. Кисла фосфатаза є специфічним маркером лізосом [2].

В результаті досліджень останніх років було встановлено, що оксид азоту, супероксиди та інші реактивні метаболіти кисню беруть участь в багатьох фізіологічних та патологічних процесах як сигнальні медіатори-проводники [22]. Регуляція перетворення різних джерел активних метаболітів кисню відбувається шляхом модифікації функції каскаду сигнальної

трансдукції. Так, продукція мембрани-асоційованих джерел цих продуктів може регулювати послідовність подій, що відбуваються на плазматичній мембрані. Якщо при високій концентрації вільні радикали кисню і їх похідні є небезпечними для живих організмів і можуть вибірково руйнувати певні клітини, то при помірній кількості ці сполуки можуть вибірково відігравати позитивну роль як регуляторні медіатори в процесах сигналізації різних фізіологічних функцій. До них відносяться регуляція судинного тонусу, моніторинг в контролі кисневої вентиляції, еритропоезу та інші. Відмічено, що при деяких видах патології спостерігається надмірне і триває збільшення продукції реактивних видів кисню [28]. Також виявлено, що ці сполуки залишаються в механізми старіння шляхом присутності їм пригнічутої активності при прогресуючих змін регуляторних процесів, які завершуються вираженими змінами гена.

В даний час, у зв'язку з нововідкритими та переглянутими раніше відомими функціональними властивостями нейтрофілів, схема взаємодії фагоцитів з патогенами значною мірою модифікована [14, 29].

Особливий інтерес при дослідженні білків плазматичних гранул нейтрофілів (а їх більше 40) викликають не ферментні бактерицидні білки, що володіють сумарним позитивним зарядом і бактерицидною дією. Ці протеїни відіграють роль медіаторів запалення, фактором проникності, стимуляції метаболічних процесів [29, 30]. Всі вони також можуть виступати в ролі фізіологічних медіаторів [20, 24, 31].

Таким чином, можна прийти до висновку, що нейтрофіли володіють багатим потенціалом низькомолекулярних біологічно активних речовин, які здатні виділятися у позаклітинний простір. Особливе місце займають і молекулярні міжклітинні медіатори, що продукуються нейтрофілами – активні метаболіти кисню та оксиду азоту. Ці міжклітинні посередники фагоцитів здатні контролювати розвиток запалення як на ранніх, так і на пізніх стадіях імунної відповіді організму, і така взаєморегуляція функціональної активності цих клітин може випливати із факту присутності в організмі їх спільної родоначальної клітини.

Література

1. Гамалей М.А. Перекись водорода как сигнальная молекула / М.А. Гамалей, И.В. Клюбин // Цитология.-1996.-т.38.-№12.-с.1233-1248.
2. Карр Я. Макрофаги. Обзор ультраструктуры и функций / Я. Карр // М.Медицина.-1978.
3. Клебанов Г.И. Клеточные механизмы прайминга и активации фагоцитов / Г.И. Клебанов // Успехи совр. биол.-1999.-119.№5.-с.462-475.
4. Маслянко Р.П. Сучасний стан вчення про фагоцитоз / Р.П. Маслянко, Р.Й. Кравців, Ю.Р. Кравців // Наук. вісник ЛНУВМБТ.-2005.-т.7, ч.1.-с.71-77.
5. Маслянко Р.П. Функціональна активність нейтрофільних гранулоцитів у проти інфекційному захисті / Р.П. Маслянко, Ю.Р. Кравців // Наук. вісник ЛНУВМБТ.-2007.-т.9.-№2.-с.185-192.

6. Маянский А.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге / А.Н. Маянский, Д.Н. Маянский // Новосибирск.-1989.
7. Babior B.M. NADF oxidase: an update / B.M. Babaior // Blood.-1999.-v.93.-p.1424-1475.
8. Babaior B.M. Investigating antibody – catalyzed ozone generation by human neutrophils / B.M. Babior, C. Takeuchi, J. Ruedi // Proc. Natl. Acad. Sci. UAS.-2003.-v.100.-p.3031-3034.
9. Beckmann J.S. Nitric oxide, superoxide peroxinitrite the good, the bad and ugly / J.S. Beckmann, W.H. Koppenol // Am.J.Physiol.-1996.-v.271.-p.1424-1437.
10. Borregaard N. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes / N. Borregaard, J. Cowland // Blood.-1997.-v.89.-p.3503-3521/
11. Burgner D. Nitric oxide and infections disease / D. Burgner, K. Rockett, D. Kwiatkovsky // Arch.Dis.Child.-1999.-v.8.-p.185-189.
12. Dang P.M. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67phox and cytochrome b558 // PHAS.-2002.-v.99.-p.4262-4265.
13. De Toledo G.A. Patch – clamp measurements reveal multimodel distribution of granule sizes in rat mast cells / G.A. De Toledo, J.M. Fernandez // J.Cell.Biol.-1999.-v.110.-p.1033-1038.
14. Descamps-Latscha B. Relations polynucleares neutrophyles et monocytes-macrophages / B.Descamps-Latscha, B.Witko-Sarsat // Rev.Fr.Allergol.-1999.-v.39.-p.241-247.
15. Druge W. Free radicals in the physiological control of cell function / W.Druge // Physiol.Rev.-2002.-v.82.-p.47-95.
16. Grandfeld D. Capacitative Ca²⁺ influx and activation of the neutrophyl respiratory burst. Different regulation of plasma membrane-and granule-localized NADPH-oxidase / D.Grandfeld // J.Leucyte Biol.-2002.-v.71.-p.611-617.
17. Johansson A. Different subcellular localization of cytochrome b ad the dormant NADPH-oxidase in neutrophils and macrophages: effect of the production of reactive oxygen species during phagocytosis / A. Johansson, A.J. Jesaitis // Cellular Immunol.-1995.-v.161.-p.61-71.
18. Kieldsen L. SGp28 a novel matrix glycoprotein in specific granules of human neutrophils with similarity to a human testis – specific gene product and to a rodent sperm-coating glycoprotein / L. Kieldsen, J.C.Cowland // FEBS Lett.-1996.-v.380.-p.246-252.
19. Labor M.T. Inteference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or immune-fairy tales? / M.T. Labro // Clin.Microbiol.Rev.-2000.-v.13.-p.615-650.
20. Levi O. Therapeutic potential of the bactericidal/permeability increasing protein / O.Levi // Exp.Opin.Juvest.Drugs.-2002.-v.11.-p.159-171.
21. Lollike K. Lysozyme in human neutrophils and plasma / parameter of myelopoietic activity / K. Lollike, L. Kjeidsen // Leukemia/-1995.-v.9.-p.159-171.

22. Nathan C. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens / C. Nathan, M.Shiloh // Proc.Natl.Acad.Sci.USA.-2000.-v.97.-p.8841-8848.
23. Pabst M.J. Immunopharmacology of neutrophils / M.J. Pabst, P.G.Hellewell // London, Acad.Press.-1994.-v.16.-p.195-221.
24. Rice W.G. Defensin – rich dense granules of human neutrophils / W.G. Rice // Blood.-1987.-v.70.-p.757-768.
25. Sbarra A.J. The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes / A.J. Sbarra, M.L. Karnovsky // J.Biol.Chem.-1959.-v.234.-p.1355-1362.
26. Swanson J.A> A contractive activity that closes phagosomes in macrophages / J.A. Swanson, M.T. Johnson, K.Bemingo // J.Cell.Sci.-1999.-v.112.-p.307-316.
27. Tappe H. Localized exocytosis of primary (liposomal) granules during phagocytosis: role of Ca²⁺ - dependent tyrosine phosphorylation and microtubules / H.Tappe, W.Furuya, S.Grinstein // J.Immunol.-2002.-v.168.-p.5287-5296.
28. Erner E. GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling / E.Werner // J.Cell.Sci.-2004.-v.117.-p.143-153.
29. Witko-Sarsat V. Neutrophils: molecules, function and patophysiological specks / V.Witko-Sarsat, P.Rien // Labor.Invest.-2000.-v.80.-p.617-650.
30. Wright D.G. Human neutrophil degranulation / D.G. Wright // Method.Enzymol.-1988.-v.162.-p.538-540.
31. Zaremba K.A. Host defense functions of proteolytically processed and parent / K.A. Zaremba, S.S. Katz, B.F. Tack // Infect.Immunol.-2002.-v.70.-p.569-576.
32. Zhao X. Cathcart protein in human monocytes // J.Leukoc.Biol.-2005.-v.77.-p.414-420.

Summary

R.P. Maslyanko, Doctor of Biological Sciences, Professor
*Lviv national university of veterinary medicine and biotechnology named of S.
 Z. G'zitskyj*

THE PHAGOCYTOSIS ROLE IN IMMUNE DEFENSE OF MACROORGANISM

In this review the recent data about oxygen-depended mechanism of host defense fulfilled by phagocytic cells were presented. The directions of the reactive metabolites oxygen formation and enzymic systems participating in its` generation were described in details. The bactericidal characteristics of oxygen reactive metabolites are given, it was marked their role as like as physiologic messengers of inflammation. The differences in realization of the bactericidal activity of neutrophils of macrophages were characterized. The information about role of neutrophils in phagocytes cooperation in infection was analyzed as well as the proof of these cells ability to the synthesis and excretion of bioactive extracellular substances with low-molecular weight.

Рецензент – д.б.н., професор Куртяк Б.М.