УДК 577.115:611.018.46:612.017

БІОЛОГІЯ НЕЙТРОФІЛІВ, СУЧАСНИЙ ПОГЛЯД. ОГЛЯД

Колісник Н.В., д.б.н., професор, Качанова Ж.С., аспірант

Запорізький національний університет

Дослідження останніх років кардинально змінили уявлення про нейтрофіли – головні ефекторні клітини імунної системи. У представленому короткому огляді відображені дані формування ефекторного апарату нейтрофілів і його реалізації. Обговорюються питання праймінгу і активації нейтрофілів, шляхи і механізми їх регулювання за участю кальцію, ліпідів і окисно-відновлювальних реакцій. Розглянуто нові дані про функціональні здібності нейтрофілів здійснювати не тільки внутрішньоклітинний, але також екстрацелюлярний кілінг бактерій шляхом формування позаклітинних пасток з ДНК, гістонів і катіонних ферментів гранул; розглянуто третій вид смерті, властивий нейтрофілам – етоз. Наведені дані про потужну регуляторну роль нейтрофілів у гострому та хронічному запаленні шляхом секреції мікрочасток, генному вираженні de novo і синтезі регуляторних білків, можливості представлення антигена лімфоцитам у вогнищах запалення. Ми виділяємо актуальні питання подальшого вивчення біології нейтрофілів, яки представляють інтерес для біології та медицини.

Ключові слова: нейтрофіли, кістковий мозок, апоптоз, праймінг, активація гранул, екстрацелюлярні пастки, етоз, ліпіди, мікрочастки, глутатіон, гранули, вроджений імунітет, мієлопероксидаза, оксиданти, фагоцитоз, редокс-шляхи, S100A, тіоредоксин.

Колесник Н.В., Качанова Ж.С. БИОЛОГИЯ НЕЙТРОФИЛОВ, СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД. ОБЗОР/Запорожский национальный университет, Украина

Исследования последних лет кардинально изменили представления о нейтрофилах главных эффекторных клетках иммунной системы. В представленном кратком обзоре отражены данные формирования эффекторного аппарата нейтрофилов и его реализации. Обсуждаются вопросы прайминга и активации нейтрофилов, пути и механизмы их регуляции при участии кальция, липидов и окислительно-восстановительного пути. Рассмотрены новые данные о функциональных способностях нейтрофилов осуществлять не только внутриклеточный, но также экстрацеллюлярный киллинг бактерий путем формирования внеклеточных ловушек из ДНК, гистонов и катионных ферментов гранул, рассмотрен третий вид смерти, характерный для нейтрофилов – этоз. Приведены данные о мощной регуляторной роли нейтрофилов в остром и хроническом воспалении путем секреции микрочастиц, генном выражении de novo и синтезе регуляторных белков, возможности представлении антигена лимфоцитам в очагах воспаления. Мы выделяем актуальные вопросы дальнейшего изучения биологии нейтрофилов, представляющие интерес для биологии и медицины.

Ключевые слова: апоптоз, костный мозг, кальций, хемокины, экстрацеллюлярные ловушки, липиды, микрочастицы, глутатион, гранулы, врожденный иммунитет, миелопероксидаза, оксиданты, фагоцитоз, редокс пути, S100A, тиоредоксин.

Kolesnik N.V., Kachanova Z.S. BIOLOGY OF NEUTROPHILS, A MODERN VIEW. THE REVIEW/Zaporizhzhya, National University, Ukraine.

Several new concepts relative to neutrophil development and function have emerged recently. To shed light on these new concepts and to tie them in with previously established notions, we will follow neutrophils along their natural course. First, we will revisit their normal development in the bone marrow. Second, we will discuss the cues regulating neutrophil priming and activation. In this section, we will put particular emphasis on the calcium, lipid and redox pathways. Third, we will review the functional abilities of neutrophils. This part will highlight the groundbreaking notion that neutrophils can kill pathogens not only intracellular, but also extracellular, by casting traps made of DNA, histones and cationic enzymes. We will also review evidence that activated neutrophils, beyond their well known apoptotic fate, can also exert potent regulatory roles (notably during acute and chronic inflammation) via micro particle secretion, de novo gene expression and protein secretion, and even antigen presentation, to elicit lymphocyte responses. In conclusion, we will outline the currently limited knowledge on molecular bridges between neutrophil activation pathways, thus arguing, if necessary, that much remains to be learnt on this powerful cell of immunity.

Key words:apoptosis, bone marrow, calcium, chemokines, extracellular traps, lipids, microparticles, glutathione, granules, innate immunity, myeloperoxidase, oxidants, phagocytosis, redox system, S100A, thioredoxin.

ВСТУП

Нейтрофіли - головний вид лейкоцитів крові та кісткового мозку (КМ) ссавців. У цитоплазмі цих клітин містяться чотири типи гранул, а їх ядро складається з декількох сегментів. Тому їх називають поліморфноядерні гранулоцити [1,2]. Гранули містять безліч гідролаз різної субстратної специфічності, мієлопероксидазу (МПО), антибактеріальні фактори типу дефензинів, лізоциму і лактоферину. Вміст гранул та тонка регуляція їхньої активації забезпечує виконання нейтрофілами першої лінії імунного захисту проти вірусних, бактеріальних, грибкових і багатоклітинних патогенних мікроорганізмів. Нейтрофіли можуть відповідати на дуже широке розмаїття сигналів [3] і бути самостійним головним джерелом сигнальних молекул (цитокінів, хемокінів, факторів росту) [4]. Нейтрофіли відіграють істотну роль у запаленні, протипухлинному імунітеті, відторгненні трансплантата і автоімунних синдромах [5]. Ці клітини мають індукований активацією комплекс НАДФН-оксидазу - фермент, що перетворює молекулярний кисень на супероксид аніон, який ініціює шлях утворення молекул окислювачів, що володіють як токсичними властивостями, так і властивостями сигнальних молекул [6].

Останнє десятиріччя характеризується зміною уявлення про нейтрофіли як короткоживучі, неспецифічні, здатні тільки до фагоцитозу або екзоцитозу клітини, що руйнують свої тканини, на уявлення про специфічну зброю, що швидко мобілізується, яка кардинально залучена до активації ендотелію, моноцитів, макрофагів, дендритних клітин і Т-лімфоцитів, тобто на уявлення про нейтрофіли як головні менеджери імунного захисту. Виконувачами цього потужного дієвого захисту є вміст гранул зрілих нейтрофілів, білки, що синтезуються de novo і пряма взаємодія нейтрофілів з клітинами адаптивного імунітету.

Мета огляду - відобразити новітні дані відносно біології нейтрофілів, включаючи питання їхнього розвитку в КМ та визволення в кровоплин; сучасне поняття про стан праймінгу та активації нейтрофілів, шляхи регуляції цих станів, функціональні можливості нейтрофілів відповідно до внутрішньоклітинного та позаклітинного кілінгу патогенів, участь у регуляції імунної системи.

Актуальність питання визначається тим, що при нормальному гомеостазі циркулюючі зрілі нейтрофіли становлять приблизно 50-70% загальної кількості лейкоцитів, з абсолютним числом приблизно $55x10^6$ клітин/кг маси тіла дорослого [14,18]. У нормі підтримання гомеостазу нейтрофілів забезпечується надходженням у кров з КМ близько $57x10^6$ клітин/кг маси тіла/год [13, 16], що для дорослої людини, яка важить 70 кг, складає 10^{11} клітин/день або $1.1x10^6$ клітин/секунду. В умовах гострого запалення надходження нейтрофілів з кісткового мозку значно збільшується. З порушенням функцій нейтрофілів пов’язаний цілий ряд захворювань. Тому знання особливостей біології нейтрофілів важливі як для біолога, так і клініциста.

1 ПОХОДЖЕННЯ ТА КІНЕТИКА НЕЙТРОФІЛІВ У ЛЮДИНИ

Нейтрофіли розвиваються в КМ із загального для еозинофілів, базофілів, тучних клітин, моноцитів/макрофагів і дендритних клітин мієлоїдного попередника, що утворюється з загальної гемопоєтичної стовбурової клітини [10]. У людини нейтрофіли з’являються на 5-му тижні ембріонального розвитку спочатку в ембріональній печінці, потім – в КМ [11]. Протягом постнатального життя нейтрофіли розвиваються у КМ, формуючи мітотичний пул, який складають мієлобласти, промієлоцити і мієлоцити та постмітотичний пул, до якого входять метамієлоцити, паличкоядерні, сегментоядерні клітини та зрілі нейтрофіли [13]. 1/3 загальної кількості нейтрофілів у КМ складає мітотичний пул. Час дозрівання нейтрофілів у КМ складає від 11 до 14 днів. Зрілі нейтрофіли, що вивільняються з КМ, внутрішньосудинно утворюють два пули: маргінальний, пристінковий, малорухливий – це 2/3 загальної кількості нейтрофілів, і

циркулюючий. Маргінальний пул найбільш представлений у легенях [15]. Нейтрофіли можуть переміщатися з циркулюючого пулу до маргінального і навпаки. За відсутності запалювальних процесів у циркулюючих нейтрофілах за 6-7 годин включається вбудована програма апоптозу, і вони гинуть [16]. При запалювальних процесах у тканинах нейтрофіли, що циркулюють, мігрують у вогнища запалення, там активуються й виконують свої функції. Тривалість напівжиття нейтрофілів у вогнищах запалення складає декілька днів [17]. Відомо, що в тканинах запалення нейтрофіл може диференціюватися в клітину, яка за фенотипом і функцією нагадує макрофаг або дендритну клітину [5]. Диференціювання залежить від складу локального середовища, що оточує нейтрофіл. GM-CSF, який подовжує тривалість життя нейтрофіла після його міграції у тканини, викликає експресію молекул MHC II, дозволяючи нейтрофілам представляти антиген Т клітинам. Додаткова присутність TNF і IFNγ викликає експресію молекул MHC II, CD40, CD83, CCR6 і MCP-l, тобто диференціювання нейтрофіла до фенотипу дендритних клітин [6].

Після завершення ефекторних функцій в тканинах активовані нейтрофіли вмирають шляхом апоптозу. Вважається, що апоптоз активованих нейтрофілів здійснюється у клітинах Купфера печінки [2].

2 ПРАЙМІНГ ТА АКТИВАЦІЯ НЕЙТРОФІЛІВ. СИГНАЛИ, ЩО РЕГУЛЮЮТЬ ПРАЙМІНГ ТА АКТИВАЦІЮ НЕЙТРОФІЛІВ

Зрілі нейтрофіли знаходяться в безперервному перехідному стані спокій/праймінг/активація [7]. Праймовані нейтрофіли характеризуються станом підвищеного відгуку на подальший активуючий стимул та істотним збільшенням тривалості їхнього життя; праймовані нейтрофіли можуть повернутися до неактивного стану, активовані нейтрофіли піддаються необоротним змінам, які не залишають жодної можливості повернутися клітині в спокійний стан. Праймування на відміну від активації відбувається за відсутності зміни внутріклітинної концентрації кальцію [8]. Проте, як і активація, праймування супроводжується фосфорилюванням комплексу білків-мішеней і, крім того, активацією НАФН-оксидази [9]. При активації фосфорилювання більш поширене, ніж при праймінгу [8]. Кінази, що забезпечують фосфорилювання при праймінгу і активації, включають фосфоліпазу С і ПКС [10], MAPK, p38 і позаклітинну регульовану сигналом кіназу (ERK) [11], так само як і фосфоінозітол-3-кіназу (PI3K) [12].

Чотири великі родини рецепторів активують ці кінази при праймуванні і активації нейтрофілів [3]:

1) GPCR – рецептори, що спряжені з G-білками, з сімома трансмембранними доменами до катехоламінів, хемокінів, фактора активації тромбоцитів;

2) рецептори з єдиним трансмембранним доменом типу інтегринів і Fc-рецепторів, які вимагають для активації поперечного зшивання з утворенням гомодимерів;

3) суперродини рецепторів імуноглобулінів, типу Toll із яких 9 з 10 виражені на зрілих нейтрофілах [13], взаємодіють із патогенасоційованими молекулами типу ЛПС грам-негативних бактерій [14] або ліпотейхоєвої кислоти грам-позитивних бактерій [15];

4) рецептори з одним трансмембранним доменом для CSF і цитокінів, типу TNF-альфа, які активуються після закріплення ліганду.

Перші 3 типи рецепторів можуть забезпечити як праймінг, так і активацію, залежно від концентрації ліганду. Ініціювання збільшення внутрішньоклітинного кальцію (Cac) – ключовий момент в активації нейтрофілів. Ефекторні молекули, що забезпечують викид кальцію в цитоплазму добре охарактеризовані [16] і включають іонні канали, кінази і протеази. Функціонально викид Cac зазвичай супроводжується утворенням

ансамблю НАДФН оксидази та її активацією, збільшенням рухливості клітини і перебудовою внутрішньоклітинного цитоскелета для здійснення фагоцитозу і процесу дегрануляції [17]. Рівні Сас збільшуються після активації фосфоліпази С, яка опосередкована рецептором, і утворенням другого посередника інозитолтрифосфату (ІФ3). Проте шлях звільнення внутрішньоклітинного кальцію ендоплазматичним ретикулумом (ЕПР) забезпечується входом позаклітинного кальцію. Ключовою реакцією входу кальцію в клітину та активації нейтрофіла є робота трансмембранного кальцієвого каналу [18]. Робота трансмембранного кальцієвого каналу забезпечується внутрішньоклітинним сфінголіпідним посередником [19]. Рівні Сас можуть також бути збільшені прямим відкриттям кальцієвих каналів у плазматичній мембрані, незалежно від ЕПР-шляху [20].

3 ШЛЯХИ КІЛІНГУ БАКТЕРІЙ НЕЙТРОФІЛАМИ

Процес внутрішньоклітинного кілінгу хвороботворних мікроорганізмів нейтрофілами за допомогою фагоцитозу і подальшого злиття гранул з фагосомою є відомим [7, 21]. Більш інноваційний – екстрацелюлярний кілінг [22]. Спочатку вважали, що екстрацелюлярний кілінг здійснюється шляхом неупорядкованого звільнення катіонних протеаз, окислювачів і МПО. Це явище, як вважали, супроводжується пошкодженням власних тканин або безпосередньо [23], або через індукцію антинейтрофільних автоантитіл [24]. Новизна роботи [22] полягає в ідентифікації організованих структур, що викидаються нейтрофілами in vitro і in vivo у позаклітинне навколишнє середовище. Ці структури, названі позаклітинними нейтрофільними пастками (NETs), мають здатність перешкоджати поширенню патологічного процесу. Вони складаються з тонких аніонних петель ДНК, у якій антибактеріальна активність виявляється не лише катіонними протеазами, але також і гістонами. Ці результати узгоджуються з даними про антибактеріальну активність гістонів [25] і з фактом, що екзоцитоз первинних гранул відбувається частіше, ніж думали раніше, наприклад, при активації фібриногеном [26]. NETs формуються у відповідь на стимуляцію нейтрофіла типовими медіаторами запалення – IL-8, форболмірістатацетатом і ЛПС, у присутності або відсутності бактерій і блокади фагоцитозу цитохалазином D [27]. Цікаво, що NETs формують тільки активовані зрілі нейтрофіли [28].

Як частину озброєння нейтрофіла розглядають мікрочастки та цитозольні фактори. Мікрочастки нейтрофілів – зовнішні одиниці, на декілька порядків менші, ніж гранули, містять певний набір розчинних і мембранних білків [29]. Їх секреція in vitro блокується агентами поперечних зшивань на мембрані [30] та індукується в умовах запалення [31]. Роль цих часток не зовсім зрозуміла. Припускають, що вони модулюють властивості клітин ендотелію [32] і моноцитів [33]. Мікрочастки можуть також брати участь в антибактеріальних реакціях, використовуючи ті катіонні протеази і МПО, що містяться на їхній поверхні [34].

Чисельні чинники цитозолю нейтрофілів знайдені в запалених тканинах і рідинах, так само як у плазмі, особливо специфічні білки, що зв'язують кальцій - S100a8 і S100a9 [35]. Білки S100a8 і S100a9 складають 40 % всіх вільних цитозольних білків у нейтрофілах і можуть формувати гомо-, або гетеродимери [36]. Білки S100a8 і S100a9 також знайдені навколо нейтрофілів, де вони виконують безліч функцій, включаючи функцію хематрактантів нейтрофілів, антибактеріальну активність, індукцію апоптозу у фібробластах і клітинах пухлин [37 – 39].

Доведено, що нейтрофіли можуть синтезувати нові білки [40,41]. Вони можуть також відповісти на всілякі стимули шляхом перебудови свого хроматину, який раніше вважали незворотньо стислим і нерухомим, і синтезувати широкий діапазон мРНК у відповідь на стимул, що надходить [42]. Багато важливих цитозольних чинників, що секретуються нейтрофілами після активації, включають неосинтезовані цитокіни,

хемокіни і фактори росту, які відіграють головну роль в автокринній та паракринній регуляції клітин.

4 ЕФЕКТОРИ І РЕГУЛЮВАЛЬНИКИ ФУНКЦІЇ НЕЙТРОФІЛІВ

Основну роль в ефекторній функції нейтрофілів відіграють компоненти гранул. Білки гранул нейтрофілів – ключові ефекторні молекули в імунній відповіді, що ініціюється нейтрофілами [43]. Гранули нейтрофілів класифікують на первинні, вторинні, третинні і секреторні пухирці [44, 45]. Відмінності між класами гранул можуть бути визначені після аналізу білків-маркерів. У гранулах нейтрофілів зберігається приблизно 300 різних білків [46], які можуть бути вивільнені в оточення клітини при злитті мембран гранул із мембраною нейтрофілів, або після мобілізації гранули залишатися приєднаними до мембрани нейтрофілів.

У процесі міграції з крові у вогнище запалення нейтрофіл вивільняє свої гранули в ієрархічному порядку. Секреторні пухирці вивільняються при встановленні контакту між нейтрофілом і ендотелієм; третинні гранули мобілізуються, коли нейтрофіл проникає в тканини; вторинні і первинні гранули вивільняються у вогнищі запалення [44, 45]. Таким чином, білки гранул вивільняються тоді, коли необхідна екстравазація нейтрофілів і знищення мікроорганізмів. Крім того, ці білки депонуються екстраваскулярно і функціонально зачіпають ті клітини запалення, які розташовані поблизу..

4.1 СЕКРЕТОРНІ ПУХИРЦІ

Секреторні пухирці за походженням ендосоми [44], і являють собою пул мембранозв’язаних рецепторів, які включаються в плазматичну мембрану після злиття мембрани секреторних пухирців з мембраною нейтрофіла [47]. У межах секреторної мембрани пухирців безліч рецепторів – β2-інтегринів, Cr1, рецептори форміл-пептиду (fpr), CD14, CD16, а також ферменти металопротеїназа і лужна фосфатаза. Вважають, що секреторні пухирці формуються тільки у зрілих сегментоядерних нейтрофілах при надходженні їх у кровоплин [44]. Мобілізація секреторних пухирців і вбудовування їхніх рецепторів у плазматичну мембрану нейтрофіла повністю змінює його фенотип. Таким чином, відносно недіючий нейтрофіл, під час ролінга на ендотелії, перетворюється на клітину, яка здатна до взаємодії з ендотелієм, моноцитами і дендритними клітинами та реагування на сигнали запалення з навколишнього середовища. У порожнині секреторних пухирців міститься альбумін та білок, що пов’язує гепарин (HBP), відомий також як Cap37 або азуроцидин [48]. Секреція HBP ініціює стадію екстравазації нейтрофіла, і, як вважають, має істотне значення в збільшенні судинної проникності, що ініціюється нейтрофілами [49], адгезію моноцитів до клітин ендотелію [50]. Маркерний фермент пухирців – лужна фосфатаза [44].

4.2 ВТОРИННІ І ТРЕТИННІ ГРАНУЛИ

Пероксидазонегативні гранули можуть бути розділені на вторинні і третинні [51]. Вторинні і третинні гранули значно відрізняються вмістом білків і секреторними властивостями. Вторинні гранули місять антибактеріальних з'єднань більше, ніж третинні. Третинні гранули легше, ніж вторинні піддаються екзоцитозу. Ці особливості відображають важливість третинних гранул, перш за все, як резерву матрикс-деградуючих ферментів і мембранних рецепторів, необхідних для екстравазації і діапедезу нейтрофіла. Навпаки, вторинні гранули беруть участь, головним чином, в антибактеріальних діях нейтрофілів шляхом мобілізації у фагосоми або секреції у зовнішнє середовище. В арсеналі їхніх антибактеріальних пептидів – лактоферин, NGAL, лізоцим і hCAP18, LL-37. Маркерний білок третинних гранул – фермент желатиназа, вторинних – лактоферин [52,53].

4.3 ПЕРВИННІ ГРАНУЛИ

Первинні гранули упаковані кислими гідролазами, у тому числі кислою фосфатазою і антибактеріальними білками; їхня мембрана позбавлена рецепторів. У людини антибактеріальні білки представлені нейтрофільними пептидами – α-дефензинами [54] і сериновими протеазами з антибактеріальною активністю: протеїназа 3 [55], катепсин G [56], еластаза [57] і НВР. Останній білок не виявляє протеолітичної активності. При дозріванні нейтрофілів у КМ першими ще на стадії мієлобластів формуються дефензин-негативні азурофільні гранули, дефензини (катіонні білки) в азурофільних гранулах синтезуються на другій стадії диференціювання нейтрофілів – стадії утворення промієлоцитів. Маркерний білок цих гранул фермент мієлопероксидаза.

4.4 КОНТРОЛЬ ДЕГРАНУЛЯЦІЇ НЕЙТРОФІЛІВ

Стимулятори секреторної активності нейтрофілів викликають переміщення гранул в нейтрофілах у фагосоми або до плазматичної мембрани, що призводить до їхнього зближення, злиття і вивільнення їхнього вмісту. Вивільнення вмісту гранул нейтрофілів під дією медіаторів жорстко контролюється рецептор-спряженим механізмом, який називають «регульований екзоцитоз». Є постулатом, що екзоцитоз здійснюється поетапно, в чотири дискретні кроки [58]. Перший крок екзоцитозу – мобілізація гранул у цитоплазмі та переміщення до мембрани, цей крок залежить від ремоделювання актина цитоскелету і мікротубулярного ансамблю [59]. Другий крок – приєднання гранул і стикування їх з внутрішньою стороною ліпідного бішару плазматичної мембрани нейтрофіла. Як наслідок, гранули праймуються і готові до третього кроку – швидкого злиття мембрани гранул з мембраною нейтрофіла з утворенням щілини між ними. Прикріплення і стикування мембран залежать від послідовної дії білків SNARE [60]. SNARE (від англ. soluble NSF attachment receptor) — велика група білків, що здійснює злиття внутрішньоклітинних транспортних везикул з мембраною клітин. Четвертий і завершальний крок – повне злиття мембрани гранул із плазматичною мембраною нейтрофіла в місці прикріплення гранул, викидом вмісту гранул на зовнішній бік клітини. Процес супроводжується збільшенням спільної поверхні клітини: внутрішня мембрана гранул стає частиною плазматичної мембрани нейтрофіла.

Переміщення і екзоцитоз гранул в нейтрофілах вимагають, як мінімум, збільшення внутрішньоклітинного Ca^{2+}, GTP, гідролізу ATP [61]. В екзоцитоз залучається безліч інших білків. Заключний крок екзоцитозу передбачає взаємне розпізнавання рецепторів секреторних гранул і мембрани нейтрофілів. Останнє забезпечується існуванням рецепторів на мембрані секреторних гранул і внутрішньоклітинних рецепторів на зовнішній мембрані нейтрофілів [62].

Мобілізація і екстравазація циркулюючих лейкоцитів – ключове явище в імунній відповіді після ініціації запалення. Екстравазація нейтрофілів зазвичай передує другій хвилі міграції моноцитів [64]. Встановлено, що звільнення гранул регулюється специфічними сигналами з навколишнього середовища клітини [65]. Крім того, екзоцитоз гранул змінює фенотип нейтрофілів шляхом злиття мембранозв'язаних компонентів гранул з плазматичною мембраною. Зміна фенотипу нейтрофілів дозволяє розширити та урізноманітнити взаємодію нейтрофілів з сусідніми клітинами. Поряд з антибактеріальною і протеолітичною функцією, функцією генерації АФК, багато білків мають потужні імуномоделюючі функції. Ці білки формують ефекторний і регулюючий механізми нейтрофілів, які забезпечують першу потужну лінію захисту при пораненнях та інфікуванні [43 – 45].

5 ПРОГРАМА ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ У АКТИВОВАНИХ НЕЙТРОФІЛАХ

Білки гранул синтезуються на певних стадіях дозрівання нейтрофіла в КМ і транспортуються клітиною до крові. Як тільки нейтрофіли потрапляють в кровоплин, синтез білків de novo припиняється. У недалекому минулому мігруючі в тканини нейтрофіли розглядалися як нездатні до синтезу нових білків. Проте, накопичуються свідчення, що, залишивши КМ, нейтрофіли мають широку програму експресії генів (таблиця) [66]. Отже, нейтрофіли містять не лише білки гранул для безпосередньої імунної відповіді, але також широкий діапазон цитокінів, хемокінів, рецепторів для диференціювання, розпізнавання цитокінів і хемокінів. Ці властивості нейтрофілів визначають їхню тісну взаємодію з моноцитами, макрофагами, дендритними клітинами і Т-клітинами, тобто з клітинами вродженої і адаптивної ланок імунної системи.

Таблиця – Генне вираження зрілих нейтрофілів [66].

Рецептори для				Цитокіни, хемокіни
Цитокінів та хемокінів	Диференціювання	Fc	Розпізнавання	
IFN-aRl/2,	GM-CSFR,	IgG,	TLR- 1,2,4,6,8,	IL-1α/β,
IFN γRl/2,	CSFR, 1L-6R	IgA,	CD14,	IL-8,
IL (1,4,6,10) R		IgE	MyD88	VEGF
TNFR-l/2			MD-2,	TNF,
TGF- βR2			fpr,	MlP-1α
CCR-l,-2,-3,			TREMl	MlP-2 α
1L-8Ra/B				MlP-2β
CXCR-4				MlP-3 α
				MCP-1

ВИСНОВКИ

На відміну від все ще прийнятого уявлення про те, що нейтрофіли є зумовленими і специфічними "солдатами" імунної системи, результати досліджень останніх років свідчать, що їх слід розглядати як головних менеджерів імунної системи з різноманітними функціями. Пул циркулюючих нейтрофілів, можливо, не становить гомогенної популяції.

Критично важливими є дослідження про взаємозв'язок шляхів регуляції кальцію, ліпідів і окисно-відновлювальних реакцій в активації нейтрофілів. Загалом, у цьому столітті слід очікувати перспективних досліджень з багатогранності функцій нейтрофілів та їхньої фізіологічної важливості.

УМОВНІ СКОРОЧЕННЯ

АФК – активні форми кисню;

ЕПР – ендоплазматичний ретикулум;

ІФ3 – інозитолтрифосфат;

КМ – кістковий мозок,

ЛПС – ліпополісахариди;

МПО – мієлопероксидаза,

ПКС – протеїнкіназа С;

Сас – внутрішньоклітинний кальцій

CCR – рецептори хемокінів

CD40, CD83- відповідні кластери диференціювання;

CSF – фактор, що стимулює колонії;

ERK – позаклітинна регульована сигналом кіназа;

fpr – рецептори до форміл-пептиду;

GM- CSF – фактор, що стимулює колонії гранулоцитів та макрофагів;

GPCR- рецептори, що спряжені з G-білками,

IFNγ - гама-інтерферон;

IL-8 – інтерлейкін 8;

MAPK - мітоген активована протеїнкіназа;

MHC II – головний комплекс гістосумісности клас II;

МСК-1 - протеїн хемотаксису моноцитів;

NETs – позаклітинні нейтрофільні пастки;

NGAL, hCAP18, LL-37 - антибактеріальні пептиди азурофільних гранул;

p38 – протеїн 38;

PI3K - фосфоінозитол-3-кіназа;

SNARE – велика група білків, що здійснюють злиття внутрішньоклітинних транспортних везикул з мембраною клітин;

TNF – туморнекротичний фактор.

ЛІТЕРАТУРА

1. Makam M. Activation of critical, host-induced, metabolic and stress pathways marks neutrophil entry into cystic fibrosis lungs/ M. Makam, D. Diaz, J. Laval [et al.] Department of Pediatrics, Stanford University//Proc Natl Acad Sci U S A. – 2009.– Vol.106, №14. – P.5779-5783.
2. Sohnlein O. Neutrophil granule proteins: modulators of the immune response. Thesis for doctoral degree. Stockcholm, 2008. – 72 p.
3. Dancey J.T., Neutrophil kinetics in man/ J.T Dancey, K.A., Deubelbeiss, L.A Harker [et al]//J. Clin. Invest.–1976.–Vol. 58. – P. 705-715.
4. Mary J.Y. Normal human granulopoesis revisited. I. Blood data /J.Y Mary//Biomed Pharmacother. – 1984. – Vol.38. – P 33-43.
5. Galligan C. Phenotypic and functional changes of cytokine activated neutrophils/C. Galligan,
6. T. Yoshimura//Chem. Immunol Allergy. –2003. – Vol. 83. – P.24-44.
7. Swain S.D. Neutrophil Priming in Host Defense: Role of Oxidants as Priming Agents/S.D. Swain, T.T. Rohn, M.T. Quinn//Antioxid & Redox Signal.– 2002.–Vol. 4. – P. 69-83.
8. Swain S.D. Neutrophil priming: the cellular signals that say 'amber' but not 'green/ S.D. Swain, T.T. Rohn, M.T. Quinn//Immunol Today. – 1995. – Vol.16. – P. 264-268.
9. Fu H. The mechanism for activation of the neutrophil NADPH-oxidase by the peptides formyl-Met-Leu-Phe and Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met differs from that for interleukin-8/H. Fu, J. Bylund, A. Karlsson [et al.]//Immunology. – 2004. – Vol.112. – P.201-210.
10. Hollmann M.W. Local anesthetic effects on priming and activation of human neutrophils/ Local anesthetic effects on priming and activation of human neutrophils/ M.W. Hollmann, A. Gross, N. Jelacin [et al]//Anesthesiology. – 2001. – Vol. 95. – P.113-122.

11. McLeish K.R. Activation of mitogen-activated protein kinase cascades during priming of human neutrophils by TNF-alpha and GM-CSF/ K.R. McLeish. C. Knall, RA. W. P. Gerwins [et al.]//J Leukoc Biol. – 1998. – Vol. 64. – P.537-545.

12. Hannigan M.O. Roles of PI3K in neutrophil function/M.O. Hannigan, C.K. Huang, D.Q. Wu//Curr Top Microbiol Immunol. – 2004. – Vol. 282. – P.165-175

13. Hayashi F. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function/ F. Hayashi, T.K Means, A.D. Luster//Blood. – 2003. – Vol.102. – P.2660-2669.

14. Jefferies C.A. Bruton's tyrosine kinase (Btk)—the critical tyrosine kinase in LPS signaling/ C.A Jefferies, L.A. O'Neill.//J Immunol. Lett.– 2004. – Vol. 92, №1-2. – P. 15 – 22.

15. 15.Lotz S. Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2/S. Lotz, E. Aga, I. Wilde[et al.]//J. Leukoc. Biol. – 2004. – Vol. 75. – P.467-477.

16. Elzi D.J. Receptor-Mediated Calcium Entry Is Required for Maximal Effects of Platelet Activating Factor Primed Responses in Human Neutrophils/D.J. Elzi, A.A. Hiester, C.C. Silliman [et al.]//Biochem. Biophis. Res. Commun. – 1997. – Vol.240, №3. – P.763-765.

17. Boussac M. Calcium-dependent secretion in human neutrophils: a proteomic approach/M. Boussac, J. Garin.//Electrophoresis. – 2000. – Vol.21. – P.665-672.

18. Itagaki K. Store-operated calcium entry in human neutrophils reflects multiple contributions from independently regulated pathw/K. Itagaki, K.B. Kannan, D.H. Livingston [et al.]//Immunol. – 2002. – Vol.168. – P.4063-4069.

19. Itagaki K. Sphingosine 1-Phosphate has Dual Functions in the Regulation of Endothelial Cell Permeability and Ca^{2+} Metabolism/K. Itagaki, J.K. Yun, J.A. Hengst [et al.]//JPET. – 2007. – Vol.323. – P.186-191.

20. Heiner I. Role and regulation of TRP channels in neutrophil granulocytes/I. Heiner, J. Eisfeld, A. Luckhoff.//Cell Calcium. – 2003. – Vol.33. – P.533-540.

21. 21.Booth J.W. Membrane dynamics in phagocytosis/J.W. Booth, W.S. Trimble, S Grinstein//Semin Immunol. – 2001. – Vol.13. – P. 357-364.

22. Brinkmann V. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria/V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann [et al.]//Science. – 2004. – Vol.303. – P.1532-1532.

23. Chmiel J.F. The role of inflammation in the pathophysiology of cystic fibrosis lung disease/J.F. Chmiel, M. Berger, M.W. Konstan//Clin. Rev. Allergy Immunol. –2002. – Vol.23. – P.5-28.

24. Reumaux D. Pathogenesis of diseases associated with antineutrophil cytoplasm autoantibodies/D. Reumaux, P. Duthilleul, D. Roos//Hum. Immunol. – 2004. – Vol.65.– P.1–12.

25. Wang Y. Antibacterial peptides in stimulated human granulocytes/Y. Wang, W.J. Griffiths, H. Jornvall [et al.]//Eur J Biochem. – 2002.– Vol. 269, №2. – P.512 – 518.

26. Duan Z. Novel Notch Protein, N2N, Targeted by Neutrophil Elastase and Implicated in Hereditary Neutropenia/Z. Duan, Feng-Qian Li, J. Wechsler [et al.]//Mol Cell Biol. – 2004.– Vol.24. – P.58-70

27. Fuchs T.A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps T.A. Fuchs, U. Abed, C. Goosmann [et al.]//J. Cell Biol. –2007. – Vol.176, No.2. – P.231-241.

28. Neeli I. Regulation of Extracellular Chromatin Release from Neutrophils/I. Neeli, N. Dwivedi, S. Khan [et al.]//J Innate Immun. – 2009. – Vol.1. – P.194-201.

29. Qu Y. P2X7 receptors regulate multiple types of membrane trafficking responses and non-classical secretion pathways/Y. Qu, G.R Dubyak//Purinergic Signal. – 2009. – Vol.5, № 2. – 163-173.

30. Gasser O. Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils/O. Gasser, C. Hess, S. Miot//Exp Cell Res. – 2003. – Vol. 285. – P.243-257.

31. Piccin A. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications /A. Piccin, W.G. Murphy, O.P. Smith//Blood Rev. – 2007 – Vol.21, №3. – P.157-171.

32. Mesri M. Endothelial cell activation by leukocyte microparticles/M. Mesri, D.C. Altieri//J Immunol. – 1998. – Vol.161. – P.4382-4387.

33. Hugel B. Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin/B. Hugel, M.C. Martínez, C. Kunzelmann, J.-M. Freyssinet//Physiol. – 2005. – Vol.20. – P.22-27.

34. Sadallah S. Erythrocyte-derived ectosomes have immunosuppressive properties/S. Sadallah, C. Eken, J.A. Schifferli//JLB. – 2008. – Vol.84. – P.1316-1325.

35. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles /R. Donato//Int J Biochem Cell Biol. – 2001. – Vol.33. – P. 637-638.

36. Goyette J. Pleiotropic Roles of S100A12 in Coronary Atherosclerotic Plaque Formation and Rupture/ J. Goyette, W. Yan, E.Yamen [et al.]//J Immuno. – 2009. – Vol. 183. – P.593-603.

37. Santamaria-Kisiel L. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family/L. Santamaria-Kisiel, A.C. Rintala-Dempsey, G.S. Shaw//Biochem. J. – 2006. – Vol. 396. – P.201-214.

38. Roth J. Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules/ J. Roth, Th. Vogl, C. Sorgr [et al.]//Trends Immunol. – 2004. – Vol.24, №4. – P.155-158.

39. Johne B. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein/B. Johne**,** M.K. Fagerhol, T. Lyberg [et al.]//Mol Pathol. – 1997. – Vol 50, №3. – P.113-123.

40. Theilgaard-Monch K. The transcriptional activation program of human neutrophil/*K.* Theilgaard-Mönch, S. Knudsen, P. Follin [et al.]*//J* Immunol. – 2004. – Vol.172. – P.7684-7693.

41. Yost C.C. Activated polymorphonuclear leukocytes rapidly synthesize retinoic acid receptor-α: A mechanism for translational control of transcriptional events/C.C. Yost, M.M. Denis, S. Lindemann [et al.]//J. Exp. Med. – 2004. – Vol.200. – P.671-680.

42. Zhang X. Gene expression in mature neutrophils: early responses to inflammatory stimuli/X. Zhang, Y. Kluger, Y. Nakayama[et al.]//J Leukoc Biol. – 2004. – Vol.75. – P.358-372.

43. Chertov 0. Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses/ 0.Chertov, D. Yang, O.M. Howard [et al.]//lmmunol Rev. – 2000. – Vol.177. – P.68-78.

44. Lominadze G, Powell DW, Luerman GC et al. Proteomic analysis of human neutrophil granules./G. Lominadze, D.W. Powell, G.C. Luerman [et al.]//Mol Cell Proteomics. – 2005.– Vol.4. – P.1503-1521.

45. Sengelov H., Voldstedlund M., Vinten J. et al. Human neutrophils are devoid of the integral membrane protein caveolin/H. Sengelov, M. Voldstedlund, J. Vinten [et al.]//J Leukoc Biol.– 1998. – Vol.63. – P.563-566.

46. Tapper H. Secretion of heparin-binding protein from human neutrophils is determined by its localization in azurophilic granules and secretory vesicles/ H. Tapper, A. Karlsson, M. Morgelin [et al.]//Blood. – 2002. – Vol. 99. – P.1785-1793.

47. Gautam N. Heparin-binding protein (HBP/CAP37): a missing link in neutrophil-evoked alteration of vascular permeability/ N. Gautam, AM. Olofsson, H. Herwald [et al.]/Nat Med. – 2001.– Vol 7. – 1123 -1127.

48. 48. Soehnlein O. Neutrophil-derived heparin-binding protein (HBP/CAP37) deposited on endothelium enhances monocyte arrest under flow conditions/O. Soehnlein., X. Xie, H. E. Ulbrich [et al.]//J Immunol. – 2005. – Vol.174. – P.6399-6405.

49. Lee T.D. CAP37, a neutrophil-derived inflammatory mediator, augments leukocyte adhesion to endothelial monolayers/T.D. Lee, M.L. Gonzalez, P. Kumar [et al.]//Microvasc Res. – 2003. – 66. – P.38-48.

50. Lekstrom-Himes J.A. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes/ J.A. Lekstrom-Himes, N. Gallin, L. Kjeldsen [et al.]//N Engl J Med. 2000. – Vol.343. – P.1703-1714.

51. Kjeldsen L. Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase-containing granules/L. Kjeldsen, O.W. Bjerrum, J.Askaa [et al.]//Biochem J. – 1992. – Vol. 287. – P.603-610.

52. Jesaitis A.J. Ultrastructural localization of cytochrome b in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes/ A.J. Jesaitis, E.S. Buescher, D. Harrison. [et al.]//J Clin Invest. – 1990. – Vol.85. – P.821-835.

53. Mollinedo F. Major co-localization of the extracellular-matrix degradative enzymes heparanase and gelatinase in tertiary granules of human neutrophils/F. Mollinedo, M. Nakajima, A. Llorens [et al.]//Biochem J. – 1997. – Vol. 327.– P.917-923.

54. Borregaard N. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins/N. Borregaard, O.E. Sorensen, K. Theilgaard-Monch//Trends Immunol. 2007.– Vol.28. – P.340-345.

55. Campanelli D. Cloning of cDNA for proteinase 3: a serine protease, antibiotic, and autoantigen from human neutrophils/D. Campanelli, M. Melchior, Y. Fu [et al]//J Exp Med. – 1990. – Vol.172. – P.1709-1715.

56. Salvesen G. Molecular cloning of human cathepsin G: structural similarity to mast cell and cytotoxic T lymphocyte proteinases/G. Salvesen, D Farley, L. Shuman [et al.]// Biochemistry. – 1987. – Vol.26. – P.2289-2293.

57. Shapiro SD: Neutrophil elastase: path clearer, pathogen killer, or just pathologic?/SD Shapiro//Am J Respir Cell Mol Biol.– 2002.– Vol.26. – P.266-268.

58. Toonen R.F. Vesicle trafficking: pleasure and pain from SM genes/R.F. Toonen, M. Verhage//Trends Cell Biol. – 2003.–.Vol.13. – P. 177-186.

59. Burgoyne R.O. Secretory granule exocytosis /R.O. Burgoyne, A. Morgan // Physiol J Rev. – 2003. – Vol.83. – P.581-632.

60. Stow T.I.. SNAREing immunity: the role of SNAREs in the immune system/T.I. Stow, A.P. Manderson, R.Z.. Murray//Nat Rev lmmunol. – 2006. – Vol.6. – P.919-929.

61. Theander S. Granule-specific ATP requirements for Ca^{2+}-induced exocytosis in human neutrophils. Evidence for substantial ATP-independent release/S. Theander, D.P. Lew, 0. Niisse//J Cell Sci. – 2002. – Vol.115. – P.2975-2983.

62. Sollner T. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion/ T. Sollner, S.W. Whiteheart, M. Brunner// Nature. – 1993. – Vol.362. – 318-324.

63. Zhang Y. Comparative proteomic analysis of human placenta derived from assisted reproductive technology/Y. Zhang, YL. Zhang, C. Feng. [et al.]//Proteomics. – 2008. – Vol.8. – P.4344-4356.

64. Zhang Y. The role of Rho GTPases and SNAREs in mediator release from granulocytes/Y. Zhang, Y.L. Zhang, C. Feng et al.//Pharmacol Ther. – 2005. – Vol.107, №3. – P.358-376.

65. Lacy P. Control of granule exocytosis in nentrophils/ P. Lacy, G. Eitzen//Front Biosci. – 2008. – Vol.13. – P. 5559-5570.

66. Theilgaard-Monch K. Systems biology of neutrophil differentiation and immune response/K. Theilgaard-Monch, B.T. Porse, N. Borregaard//Curr Opin Immunol. – 2006. – Vol.18. – P.54-60.

УДК 612.825:[546.47:546.41/46.22]

СУДОМНА АКТИВНІСТЬ ТА ХЕЛАТУВАННЯ ЦИНКУ В ГІПОКАМПІ ПРИ ПОПЕРЕДНЬОМУ ВВЕДЕННІ МИШАМ СОЛЕЙ КАЛЬЦІЮ І МАГНІЮ

Кучковський О.М., викладач, Єщенко Ю.В., к.б.н., доцент,
Бовт В.Д., д.б.н., професор, Єщенко В.А., д.мед.н., професор,
Григорова Н.В., к.б.н., доцент, Омельянчик В.М., к.мед.н., доцент,
Карпов А.К., аспірант

Запорізький національний університет

У дослідах на мишах було показано, що введення їм 8-(бензолсульфоніламіно)-хіноліну (8-БСХ) викликало розвиток його інтравітальної реакції в гіпокампі та судом. Попереднє введення тваринам солей кальцію та магнію суттєво не впливало на інтенсивність цієї реакції та судом. Висунуто припущення, що вказані зміни виникають унаслідок хелатування 8-БСХ цинку в нейронах гіпокампа.

Ключові слова: гіпокамп, кальцій, магній, судоми, хелатуючий агент, цинк

Кучковский О.Н., Ещенко Ю.В., Бовт В.Д., Ещенко В.А., Григорова Н.В., Карпов А.К. СУДОРОЖНАЯ АКТИВНОСТЬ И ХЕЛАТИРОВАНИЕ ЦИНКА В ГИППОКАМПЕ ПРИ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ МЫШАМ СОЛЕЙ КАЛЬЦИЯ И МАГНИЯ /Запорожский национальный университет, Украина

В опытах на мышах было показано, что введение им 8-(бензолсульфониламино)-хинолина (8-БСХ) вызывало развитие его интравитальной реакции в гиппокампе и судорог. Предварительное введение животным солей кальция и магния значительно не влияло на интенсивность этой реакции и судорог. Выдвинуто предположение, что указанные изменения возникают вследствие хелатирования 8-БСХ цинка в гиппокампе.

Ключевые слова: гиппокамп, кальций, магний, судороги, хелатирующий агент, цинк

Kuchkovsky O.M., Eshchenko J.V., Bovt V.D., Eshchenko V.A., Grigorova N.V., Karpov A.K. CONVULSION ACTIVITY AND ZINC CHELATING IN HIPPOCAMPUS UNDER PREVIOUS INJECTION CALCIUM AND MAGNESIUM SALTS TO MICE /Zaporizhzhya national university, Ukraine