

УДК 612.112.91

Маслянюк Р.П., д.б.н., професор; ©
Левківський Д.М., к.вет.н., доцент;
Олексюк І.І., к.б.н., доцент;
Падовський А.І., к.вет.н., доцент.

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

СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО БАКТЕРИЦИДНУ АКТИВНІСТЬ ФАГОЦИТІВ

Е роботі представлені сучасні дані про кисневозалежні механізми захисту макроорганізму, що здійснюється фагоцитуючими клітинами. Детально описано шляхи утворення реактивних метаболітів кисню в клітинах і ферментні системи, які беруть участь у цьому процесі. Охарактеризовано бактерицидні властивості реактивних метаболітів кисню та висвітлена їх роль як фізіологічних медіаторів при запаленні. Відмічено різниці в реалізації бактерицидної активності нейтрофільних гранулоцитів і макрофагів при інфекціях і наведено докази про здатність цих клітин до синтезу і секреції низькомолекулярних біологічно активних речовин.

Ключові слова: нейтрофіли, макрофаги, бактерицидні речовини.

Згідно з сучасними даними [5], відомо два виражено розпізнавальних функціональних стани фагоцитів: вихідний, так званий «gedox», з низьким рівнем перебігу процесів, і активований, перехід у який зумовлений взаємодією клітини з різними стимуляторами. При цьому в процесі попередньої дії стимулів, зокрема бактерій, відбувається збільшення функціонального потенціалу нейтрофілів і макрофагів – посилення міграції, адгезії, дегрануляції та метаболізму [24]. Це явище, починаючи з 1980 р.[24], стосовно фагоцитів отримало назву праймінгу (priming), тобто підготовки, переводу клітин в активний робочий стан. Таким чином, нейтрофіли, досягнувши місць запалення, здатні розпізнати антиген (патоген) або безпосередньо через мембранні рецептори для опсонинів (фактори комплементу C₃b і Fc компонент імуноглобулінів), або через лектини мікробів і фагоцитів (опсонін-незалежний фагоцитоз). Надалі починається процес фагоцитозу, що здійснюється за допомогою механізму, який діє як «замок-стіжка (змійка)» (від англ. zipper), тобто, послідовного розпізнавання патогенів псевдоподіями фагоцитів, відбувається поглинання мікробів шляхом інвагінації плазматичної мембрани клітин та утворення фагоцитарної вакуолі [6, 8]. При цьому паралельно активуються дві функції фагоцитів: викид вмістимого гранул у фагосому та кисневий вибух. Цей процес вперше описаний у 1933 р. і полягає в тому, що фагоцити різко збільшують потребу в кисні – у 50-100 разів, а сам процес відбувається при стимуляції комплексу НАДФ-оксидази [5].

Продукт відновлення НАДФ-оксидазного комплексу супероксидний радикал – $O^{\cdot -}$ – є початковим матеріалом для продукції широкого ряду реактивних оксидантів, включаючи окисні галогени, вільні радикали та синглетний кисень. Ці окиснювачі використовуються для знищення поглинених мікробів, але вони також викликають численні руйнації оточуючих тканин, тому їх формування повинно бути відрегульованим для того, щоб було відомо коли й де вони відтворені.

Другим етапом цього процесу є перетворення супероксидного аніону $O^{\cdot -}$ в наступний могутній окисний компонент – перекис водню (H_2O_2) – може відбуватися спонтанно або каталізуватися супероксид-дисмутазою. Спонтанна реакція відбувається при $pH=4,8$, при якому виявляється рівна кількість $O^{\cdot -}$ і H_2O_2 . При підвищених показниках pH і переважанні $O^{\cdot -}$ – знижується активність спонтанної дисмутації цього радикалу та включається процес каналізації супероксиддисмутазою [3]. Подібний ефект спостерігається лише тоді, коли є її висока концентрація. Таким чином, як утворений супероксид, так і перекис водню не спроможні безпосередньо вбивати бактерії [28].

Більш могутніми за бактерицидною дією є інші реактивні метаболіти кисню, які утворені із перекису водню. У фагоцитах наявні чотири потенційні механізми перетворення перекису водню. Перший шлях здійснюється за допомогою реакції Фестона, яка була описана ще в 1894 р. за участю сульфату заліза. Її результатом є гідроокисний радикал $\cdot OH$. При подальшому дослідженні в 1934 р. Хабер і Вейс виявили, що утворення гідроокисного 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 отримала назву супероксид-керована реакція, або реакція Хабер-Вейса.

Гідроксильні радикали виявляють пошкоджуючу дію на бактерії [15]. Вони здатні, діючи на SH-групи, різні амінокислотні складові білків, викликати їх денатурацію, таким чином дезактивуючи ферменти. Крім цього в нуклеїнових кислотах $\cdot OH$ руйнує вуглеводні містки між нуклеотидами та розриває ланцюги ДНК і РНК, що може стати причиною мутацій і загибелі бактерій. Однак, за рядом причин ці радикали не настільки ефективні в бактерицидній дії, як може припускати їх висока реактивність. До них належить обмежена дія цих сполук через простір фагосом, а також вони можуть прореагувати з іншими субстратами, не досягнувши бактерій. Однак, було відмічено, що гідроксильні радикали, вироблені системами, включаючи хлориди, найбільш токсичні для бактерій [28].

Синглетний кисень (1O_2) також виробляється нейтрофілами при взаємодії гідроксильного радикалу з $HOCl$, хоча спочатку припускали, що цей реактивний вид кисню був джерелом хемілюмінесценції стимульованих клітин, подальші дослідження методом специфічного інфрачервоного випромінювання не виявили продукцію синглетного кисню нейтрофілами [22].

Недавно було названо ще один реактивний метаболіт кисню – продукт респіраторного вибуху в нейтрофілах: озон (O_3) [9].

В останні роки активно досліджуються інші метаболіти, зокрема, оксид азоту (NO), присутність якого відмічають у фагоцитах. NO є вільним радикалом (газовою молекулою), продукується з молекулярного кисню та гуанідинового нітрогену L-аргініна, складеного в L-цитруліні [23]. Встановлено, що NO включається до неспецифічного імунітету та частково до комплексного механізму тканинного пошкодження як важливий медіатор запальних процесів і апоптозу. При цьому цитотоксична/цитопатична дія посилюється завдяки здатності NO вступати в реакцію з супероксидним радикалом, утворюючи пероксинітрит. Ця сполука володіє значно вищою реакційною здатністю, ніж NO чи супероксидний радикал зосібно [11]. За даними [14] система, що включає реактивні посередники азоту, похідні індуцибельної нітроксидсинтетази (iNOS), існує не лише в макрофагах, але й в нейтрофілах.

В результаті досліджень останніх років було встановлено, що NO супероксиди та інші реактивні метаболіти кисню беруть участь в багатьох фізіологічних і патологічних процесах як сигнальні медіатори-провідники [17]. Регулювання перетворення різних джерел реактивних метаболітів кисню відбувається шляхом модифікації функції каскаду сигнальної трансдукції. Так, рання продукція мембран-асоційованими джерелами цих продуктів може регулювати послідовність подій, які відбуваються на плазматичній мембрані, наприклад, включення рецептора сигналу фактора росту чи формування фокусної адгезії, тоді коли їх пізніша продукція може модулювати внутрішньоклітинні кінази та редокс-чутливі фактори транскрипції. Якщо при високій концентрації вільні радикали кисню і їх похідні є небезпечними для живих організмів і можуть вибірково руйнувати певні клітини, то при помірній концентрації ці сполуки можуть відіграти роль в якості регуляторних медіаторів у процесах сигналізації різних фізіологічних функцій. До них відносяться: регуляція тону судин, здійснення моніторингу в контролі кисневої вентиляції, продукції еритропоезу та інші [27]. Також відмічено, що ці сполуки залучаються в механізм старіння за допомогою притаманної їм ушкоджуючої активності у прогресуючих змінах регуляторних опосередкованих процесах, які завершуються вираженими змінами гена. Крім цього показано, що NO та реактивні метаболіти кисню можуть викликати апоптоз різних типів клітин.

В даний час, у зв'язку із заново відкритими та переглянутими раніше відомими функціональними властивостями нейтрофілів, схема взаємодії фагоцитів з патогенами в значній мірі була модифікована [16,28]. По-перше, відмічається більш тривалий період життя нейтрофіла, особливо при запальних процесах та інфекціях; по-друге, з'ясовані нові рецептори, здатні розпізнати імуномодулятори; по-третє, якщо раніше заперечувалася здатність цих клітин до синтезу різних біологічно активних речовин, то на даний період вона не викликає сумніву [20]. До них належать цитокини (ФНП – фактор некрозу пухлин, інтерлейкіни – ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-3, ІЛ-6, ІЛ-8, колоніестимулюючі фактори, комплементарні білки, дефенсини та інші. Уточнюється роль різних фагоцитів у специфічно набутому імунітеті тварин. Зокрема, доведено, що нейтрофіли здатні кооперувати з професійними антигенпредставляючими клітинами через передобробку та протеоліз антигенів. При цьому вони можуть викликати

експресію молекул II класу гістосумісності на моноклеарних клітинах, а також представляють антиген для вірус-специфічних Т-лімфоцитів – пам'яті. Ці властивості з'являються паралельно зі збільшенням активності мієлопероксидази. Інший регуляторний аспект нейтрофілів включає продукцію та екзоцитоз різних факторів, які модулюють функції лімфоцитів, моноцитів та еозинофілів.

За сучасними даними, в групі цитокінів знаходиться велика кількість антимікробних пептидів, які нейтрофіли здатні виділяти у позаклітинний простір у вогнищах запалення. Подальші дослідження стосуються функціональних властивостей різних низькомолекулярних білків, які беруть участь у запаленні [1, 22].

При дослідженні білків цитоплазматичних гранул нейтрофілів, а їх більше 40, викликають неферментні бактерицидні білки з низькою молекулярною масою з сумарним позитивним зарядом і бактерицидною дією. Ці протеїни відіграють роль медіатора запалення, фактору проникності, стимулятора метаболічних процесів, служити джерелом опсонінів при фагоцитозі [28, 30]. Дані білки є специфічним маркером нейтрофілів. До групи цих протеїнів відносяться також так звані білки, що підвищують бактерицидні властивості клітин, кателіцидини, які містяться в неактивній формі в азурофільних гранулах нейтрофілів. Всі вони можуть виступати в ролі фізіологічних медіаторів [22, 25, 30].

Наступна важлива група антимікробних пептидів – це дефенсини, низькомолекулярні катіонні пептиди, що містять 6 цистеїнових і дисульфідних зв'язків. Їх дія спрямована проти грамположитивних і грамнегативних мікроорганізмів: здійснюється за допомогою порушення цілісності бактеріальних мембран. Крім бактерицидності, дефенсини проявляють властивості регуляторів запального процесу, зв'язуючись з інгібіторами протеїнази, таких як альфа1-антитрипсин та альфа1-антихемотрипсин [25].

Таким чином, можна прийти до висновку, що нейтрофіли володіють багатим потенціалом низькомолекулярних біологічно активних речовин, які вони здатні виділяти в позаклітинну циркуляцію в організмі. Певне місце займають молекулярні міжклітинні медіатори, що виділяються нейтрофілами – активні метаболіти окису азоту та кисню. Ці міжклітинні посередники фагоцитів здатні контролювати розвиток запалення на різних стадіях імунної відповіді організму й така взаєморегуляція функціональної активності цих клітин може бути наслідком присутності в організмі їх загальної родоначальної клітини.

Література

1. Долгушин И.И. Роль нейтрофилов в регуляции иммунной реактивности и репаративных реакций поврежденной ткани/И.И. Долгушин, А.В. Зурочка, А.В. Чукичев//Вестн. РАМН.-2010.-№2.-С.14-17.
2. Галанкин В.Н. Проблемы воспаления с позиций теорий и практики /В.Н. Галанкин, А.М. Токмаков// Унив. дружбы народов.-1991.-С.42-48.
3. Гамалей И.А. Проблеммы воспаления с позиции теории и практики/И.А. Гамалей, И.В. Кмобин//Цитология.-1996.-№38.-С.1233-1248.

4. Карр Я. Макрофаги. Обзор ультраструктуры и функции /Я. Карр// М. Медицина.-1978.
5. Клебанов Г.И. Клеточные механизмы прайминга и активации фагоцитов/Г.И. Клебанов, Ю.А. Владимиров//Успехи совр. биол.-1999.-№119(5).-С.462-475.
6. Маслянюк Р.П. Функціональна активність нейтрофільних гранулоцитів у протиінфекційному захисті тварин/Р.П. Маслянюк, Ю.Р. Кравців//Наук. вісник ЛНУВМ та БТ.-2007.-т.9(33).-С.185-193.
7. Маслянюк Р.П. Функціональна активність нейтрофілів крові ягнят при гострій і затяжній діареї Р.П. Маслянюк, Д.М.Левківський// Наук. вісник ЛНУВМ та БТ.-2007.-т.9(32).-С.42-49.
8. Маслянюк Р.П. Сучасний стан вчення про фагоцитоз /Р.П. Маслянюк, Ю.Р. Кравців// Наук. вісник ЛНАВМ.-2005.-Т7-№2,ч.1. С.71-77.
9. Babior V.M. Investigating antibody catalyzed ozone generation by human neutrophils/ V.M. Babior, C. Takeuchi, J. Buedi// Proc. Natl. Acad. Sci., USA.-2003.-v.100.-P.3031-3034.
10. Batandier C. Determination of mitochondrial reactive oxygen species: methodological species/ C.Batandier, E. Fontaine, C.Kriegl// J.Clin. Mol. Med.-2002.-v.6.-P.175-182.
11. Beckman J.S. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite the good, the bad and ugly/J.S. Beckman, W.H. Koppenol// Am. J. Physiol.-1996.-v.271.-P.1424-1437.
12. Bey E.A. Protein-kinase C is required for P47 PHOX phosphorylation and translocation in activated human monocytes /E.A. Bey// J. Immunol.-2004.-V.173.-P.5730-5738.
13. Borregaard N. Granules of the human neutrophil polymorphonuclear leukocytes/N.Borregaard, J.B. Cowband//Blood.-1997.-v.89.-P.3503-3502.
14. Burgner D. Nitric oxide and infectious diseases/D.Burgner, K.Rockett//Arc.Dis.Child.-1999.-v.8.-P.185-189.
15. De Toledo G.A. Patch-clamp measurements reveal multimodal distribution of granule sizes in rat mast cells/G.A. De Toledo, J.M. Fernandez//J.Cell.Biol.-1990.-v.110.-P.1033-1038.
16. Descamps-Latscha B. Relations polynucleares neutrophiles et monocytes-anacrophages/B.Descamps-Latscha, V.Witko-Sarsat// Rev. Fr. Allergol.-1990.-v.39.-P.241-247.
17. Druge W. Free radicals in the physiological control of cell function/W.Druge//Physiol.Rev.-2002.-v.82.-P.47-95.
18. Grandfeldt D. Capacitative Ca^{2+} influx and activation of the neutrophil respiratory burst. Different regulation of plasma membrane and granule-localized NADPH-oxidase/D.Grandfeldt, M.Samuelsson, A.Karlsson//J.Leukocyte Biol.-2002.-v.71.-P.611-617.
19. Klebanoff S.J. Myeloperoxidase: friend and foe/S.J. Klebanoff// J. Leukoc. Biol.-2005.-v.77.-P.598-625.

20. Kurnucz G.F. Serum proteins modified by neutrophil-derived oxidants as mediators of neutrophil stimulation/G.F. Kurnucz// J.Immunol.-2001.-v.167.-P.451-460.
21. Labro M.T. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: Immunomodulation of immune-fairy tales/M.T. Labro// Clin. Microbiol. Rev.-2000.-v.13.-P.615-630.
22. Levi O. Therapeutic potential of the bactericidal/permeability increasing protein/O. Levi//Expert.Opin.Investig.Drugs.-2002.-v.11.-P.150-167.
23. Nathan C. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian host and microbial pathogens/C.Nathan, M.Shiloh// Proc. Soc. Acad. Sci. USA.-2000.-v.67.-P.8841-8848.
24. Pabst M.J. Priming of neutrophils /M.J. Pabst// London, Academic Press.-1994.-V.42.-P.195-221.
25. Rice W.G. Defensin-rich dense granules of human neutrophils / W.G. Rice // Blood.-1987.V.70.-P.757-768.
26. Swanson J.A. Acontractile activity that closes phagosomes in macrophages / J.A. Swanson // J. Cell. Sci.-1999.-V.112.-P.307-316.
27. Werner E. GT Pases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling /E.Werner// J.Cell.Sci.-2004.-b.117.-P.143-153.
28. Witko-Sarsat V. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects / V.Witko-Sarsat // Labor. Investig.-2008.-v.88.-P.617-653.
29. Wright D.G. Human neutrophil degranulation / D.G. Wright // Method. Enzymol.-1988.-V.162.-P.538-540.
30. Zarembek K.A. Host defense functions of proteolytically processed and parent catelicidins of rabbit granulocytes/K.A. Zarembek// Infect. Immunol.-2002.-v.70.-P.369-376.
31. Zhao X. Cathcart proteinkinase C. regulates p67 phosphorylation in monocytes /X. Zhao, B. Xu// J.Leukocyte Biol.-2005.-v.77.-P.414-420.

Summary

R.P. Maslyanko, D.M. Levkivsky, I.I. Oleksjuk, A.I. Padovsky
Lviv national university of veterinary medicine and biotechnology
named of S. Z. G`zhitskyj

THE BACTERICIDAL ACTIVITY OF PHAGOCYTES

In this review the recent data about oxygen-dependend mechanism of host defense fulfilled by phagocytic cells were presented. The directions of the reactive metabolites oxygen formations and enzymic systems participating in its generation were described in details. The bactericidal characteristics of oxygen reactive methabolites are given, it was marker their role as like as physiologic messengers of inflammation. The differences in realization of the bactericidal activity 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 extracellularby substances with low-molecular weight.

Рецензент – д.с.-г.н., професор, член-кор. НААНУ Кирилів Я.І.