PREAKTYWACJA NEUTROFILÓW DO WYBUCHU TLENOWEGO

NEUTROPHIL PRIMING TO OXIDATIVE BURST

Anna PAŃCZYSZYN

Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej,
Uniwersytet Opolski w Opolu

Streszczenie: Neutrofile pełnią istotną rolę w obronie organizmu przed mikroorganizmami. Kierowane czynnikami chemotaktycznymi docierają do miejsc infekcji, gdzie rozpoznają i fagocytują drobnoustroje. Pod wpływem czynników chemotaktycznych neutrofile mogą ulegać preaktywacji i aktywacji, której przejawem jest uwalnianie reaktywnych form tlenu (ROS) w procesie zwanym wybuchem tlenowym oraz wydzielanie enzymów (m. in. proteaz) podczas degranulacji. Preaktywacja do wybuchu tlenowego jest ważnym procesem regulującym funkcje bakteriobójcze neutrofilów, jednak w pewnych sytuacjach może sprzyjać rozwojowi chorób. Proces preaktywacji jest odwracalny, co jest istotne w przypadku neutrofilów powracających do krwioobiegu z tkanek objętych stanem zapalnym. Wyróżnia się trzy mechanizmy preaktywacji: przebudowę cytoszkieleu prowadzącą do adhezji neutrofilów, częściową fosforylację podjednostek oksydazy NADPH oraz egzocytozę granul. Wymienione mechanizmy są kontrolowane przez skomplikowane i nie w pełni poznane szlaki sygnalne.

Słowa kluczowe: neutrofile, preaktywacja, wybuch tlenowy, oksydaza NADPH

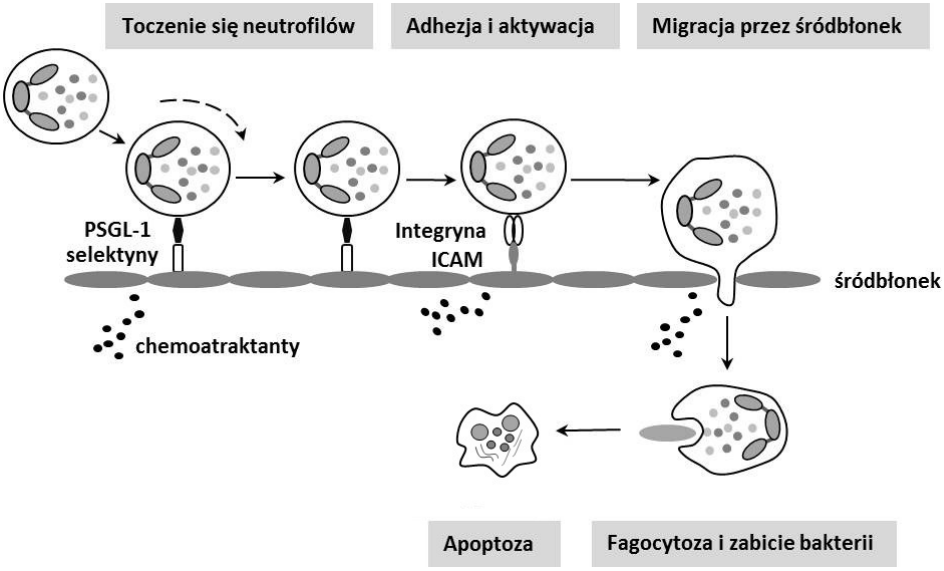
Summary: Neutrophils play an important role in innate immunity. Chemotactic agents attract neutrophil to the site of infection, where neutrophils recognize and phagocytose microorganisms. Chemotactic agents frequently prime and activate neutrophils to produce reactive oxygen species (ROS) during process termed oxidative burst and may trigger release of enzymes (including proteases) during degranulation. Priming to oxidative burst is an important process, which regulates neutrophil bactericidal functions but in some situations may lead to development of diseases. Priming is a reversible process that allows for deactivation of neutrophils migrating back from inflamed tissue to the blood circulatory system. There are three mechanisms of neutrophil priming: remodeling of the cytoskeleton, which leads to adhesion, partial phosphorylation of oxidase NADPH subunits and granule exocytosis. All of these mechanisms are controlled by complex and not fully understood signaling pathways.

Key words: neutrophils, priming, oxidative burst, NADPH oxidase

WSTĘP

Neutrofile stanowią ważny element wrodzonej, nieswoistej odpowiedzi odpornościowej. Pochodzą od multipotencjalnej komórki macierzystej szpiku kostnego. Każdego dnia w organizmie zdrowego człowieka powstaje około 10^{11} neutrofilów w procesie zwanym granulopoezą, która jest kontrolowana przez czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF). W wyniku proliferacji wielopotencjalnej komórki powstają mieloblasty, następnie promielocyty, w których rozpoczyna się proces formowania granul (ziarnistości). Promielocyty dojrzewając przekształcają się kolejno w mielocyty, metamielocyty, a następnie w neutrofile, które cechuje obecność trzech rodzajów granul oraz trójpłatowe jądro [61]. Uwolnione do krwiobiegu neutrofile dzielą się na pulę komórek krążących i pulę komórek marginalnych obecnych w śledzionie, wątrobie i szpiku kostnym, z których mogą być szybko mobilizowane do krwiobiegu. Neutrofile krążą we krwi 6-8 godzin pozostając w stanie spoczynku lub ulegają rekrutacji do miejsc infekcji [71]. Migrujące do miejsc zapalnych neutrofile najpierw toczą się po śródbłonku naczyniowym dzięki przejściowym oddziaływaniom pomiędzy obecnymi na ich powierzchni L-selektynami, cząsteczkami PSGL-1 (glikoproteinowy ligand-1 P-selektyny) i CD44 a śródbłonkowymi P-selektynami i E-selektynami, których ilość wzrasta pod wpływem czynników prozapalnych (np. N-formylo-metionylo-leucylo-fenyloalaniny – fMLP, chemokin). Toczenie się aktywuje β1 integryny (VLA-4) i β2 integryny (Mac-1, LFA-1), które oddziałują z cząsteczkami adhezyjnymi z nadrodziny białek immunoglobulinopodobnych: ICAM-1, ICAM-2 i VCAM-1 i umożliwiają adhezję neutrofilów do śródbłonka (ryc. 1) [3, 43]. Neutrofile, które uległy adhezji do śródbłonka migrują następnie do zainfekowanych tkanek podążając w kierunku wzrastającego stężenia czynników chemotaktycznych pokonując śródbłonek drogą transkomórkową lub parakomórkową [48]. Migrujące neutrofile stają się spolaryzowane, na ich powierzchni wzrasta ilość cząsteczek adhezyjnych (β1 i β2 integryn), zwiększa się ich ruchliwość i zdolność do chemotaksji. Dzięki obecności na powierzchni receptorów rozpoznających wzorce molekularne (m.in. receptorów Toll-podobnych, TLR), neutrofile rozpoznają i fagocytują drobnoustroje, a następnie niszczą je wykorzystując przy tym dwa główne mechanizmy: wybuch tlenowy i degranulację. Podczas wybuchu tlenowego kompleks enzymatyczny oksydazy NADPH, wytwarza anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-) będący prekursorem toksycznych dla mikroorganizmów reaktywnych form tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species*, ROS), m.in. kwasu podchlorawego. Degranulacja polega na uwolnieniu zmagazynowanych w ziarnistościach neutrofilowych enzymów proteolitycznych i białek przeciwbakteryjnych (np. lizozymu, α-defensyny). Enzymy i białka przeciwbakteryjne oraz ROS mogą być uwalniane do fagosomu z pochłoniętym drobnoustrojem jak i poza komórkę. Degranulacja i wybuch tlenowy są przejawem pełnej aktywacji neutrofilów, a poprzedza je preaktywa-

cja, ważny proces regulujący aktywność neutrofilów inicjowany przez kontakt ze śródbłonkiem, cytokiny prozapalne (np. czynnik martwicy nowotworów – TNF-α) i chemoatraktanty [43]. Preaktywacja polega na zwiększeniu gotowości neutrofilów do odpowiedzi na bodźce aktywujące i jest związana ze zmianami morfologicznymi neutrofilów niezbędnymi do ich adhezji (polaryzacja komórki) do śródbłonka oraz zmianami funkcjonalnymi, które powodują, że neutrofile stają się hiper-reaktywne na czynniki stymulujące (m.in. poprzez wzrost ilości receptorów powierzchniowych np. dla fMLP) [65]. Preaktywowane neutrofile cechuje wielokrotnie większy potencjał adhezyjny, zwiększona zdolność do fagocytozy, wytwarzania ROS oraz wydzielania cytokin po stymulacji przez czynnik aktywujący [10, 74]. Zaktywowane neutrofile mogą także eliminować drobnoustroje uwalniając tzw. pozakomórkową sieć (NET), która składa się z DNA, histonów i enzymów (m.in. elastazy). Sieć NET unieruchamia mikroorganizmy zapobiegając ich rozprzestrzenianiu się oraz ułatwia ich fagocytozę [37, 51]. W ostatnim etapie zaktywowane neutrofile ulegają apoptozie, a ich pozostałości usuwane są przez makrofagi [15, 48]. Natomiast w fizjologicznych warunkach niepobudzone neutrofile kierowane są z powrotem do szpiku kostnego, gdzie ulegają programowanej śmierci. Neutrofile, które obumierają w krwiobiegu mogą być także usunięte przez makrofagi w wątrobie (przez tzw. komórki Kupffera) lub śledzionie. Mechanizm ten jest niezbędny dla utrzymania homeostazy komórkowej [16, 80].



RYCINA 1. Losy neutrofilów w krwiobiegu
FIGURE 1. Neutrophil fate in circulation

Preaktywacja jest złożonym procesem przebiegającym w różnych przedziałach komórkowych i jak dotąd nie do końca poznanym. Obecnie preaktywację wiąże się z trzema mechanizmami obejmującymi: przebudowę cytoszkieletu prowadzącą do adhezji neutrofilów; fosforylację cytozolowych podjednostek oksydazy NADPH: $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ i $p40^{phox}$ oraz uwolnienie zawartości granul zawierających podjednostki oksydazy NADPH: $gp91^{phox}$ i $p22^{phox}$, a także granul zawierających receptory błonowe, białka G i inne składniki szlaków sygnalnych zaangażowanych w aktywację neutrofilów [18, 76]. Szczególnie istotna ze względu na bakteriobójcze właściwości neutrofilów wydaje się preaktywacja do wybuchu tlenowego, w której najważniejszą rolę pełni oksydaza NADPH, produkująca anionorodnik ponadtlenkowy, który jest prekursorem reaktywnych form tlenu. Z drugiej strony niekontrolowany wybuch tlenowy i nadmierna produkcja ROS może mieć niekorzystny wpływ na organizm przyczyniając się do oksydacyjnego uszkadzania lipidów (szczególnie zawierających nienasycone kwasy tłuszczowe), białek oraz materiału genetycznego i nagromadzania mutacji. Nadmierna ilość preaktywowanych neutrofilów jest dobrze udokumentowana u pacjentów z sepsą [7, 44], przewlekłą obturacyjną chorobą płuc [42] i reumatoidalnym zapaleniem stawów [83], stąd zrozumienie molekularnych mechanizmów preaktywacji neutrofilów może dostarczyć nowych sposobów do kontrolowania funkcji neutrofilów w przebiegu wielu chorób. Niniejszy artykuł ma za zadanie przybliżyć aktualną wiedzę na temat szlaków sygnalnych uruchamianych podczas preaktywacji neutrofilów do wybuchu tlenowego.

CZYNNIKI PREAKTYWUJĄCE NEUTROFILE

Neutrofile mogą ulegać preaktywacji pod wpływem chemoatraktantów takich jak: fMLP, PAF (czynnik aktywujący płytki krwi), GM-CSF (czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów), LTB4 (leukotrien B4), IL-18 (interleukina 18). Czynniki preaktywujące neutrofile dzieli się na dwie grupy w zależności od szybkości ich działania. Do czynników działających szybko (3-5 minut) należą: PAF, LTB4, składnik dopełniacza C5a, natomiast do grupy czynników działających wolno (15-60 minut) zalicza się: LPS (lipopolisacharyd), TNF-α, GM-CSF oraz IL-8 (interleukina 8) [65]. Niektóre czynniki w zależności od stężenia nie tylko preaktywują, ale także aktywują neutrofile (np. fMLP w stężeniu poniżej 300 nM preaktywuje neutrofile, a w wyższych stężeniach aktywuje neutrofile do wybuchu tlenowego) [41]. Adhezja neutrofilów do macierzy międzykomórkowej podczas migracji również inicjuje ich preaktywację [18].

Pomimo strukturalnych różnic w budowie czynników chemotaktycznych większość z nich wiąże się z receptorami z rodziny GPCR (receptory sprzężone z białkiem G). Po przyłączeniu liganda do receptora GPCR, zaktywowany GPCR

stymuluje podjednostkę α białka G do wymiany GDP na GTP i następuje oddysocjowanie podjednostki α od podjednostki βγ. Podjednostka α bierze udział w aktywacji białka Rho, natomiast podjednostka βγ aktywuje białka sygnalizacyjne: kinazę 3 fosfatydyloinozytolu (PI3K), małe białka wiążące GTP, kinazę MAPK (kinaza aktywowana mitogenem). Rozdzielone podjednostki receptora aktywują także fosfolipazę C (PLC), która bierze udział w powstawaniu cząsteczek sygnalizacyjnych odpowiedzialnych za aktywację białkowej kinazy C (PKC) i wzrost stężenia wapnia w komórce [23, 24, 57].

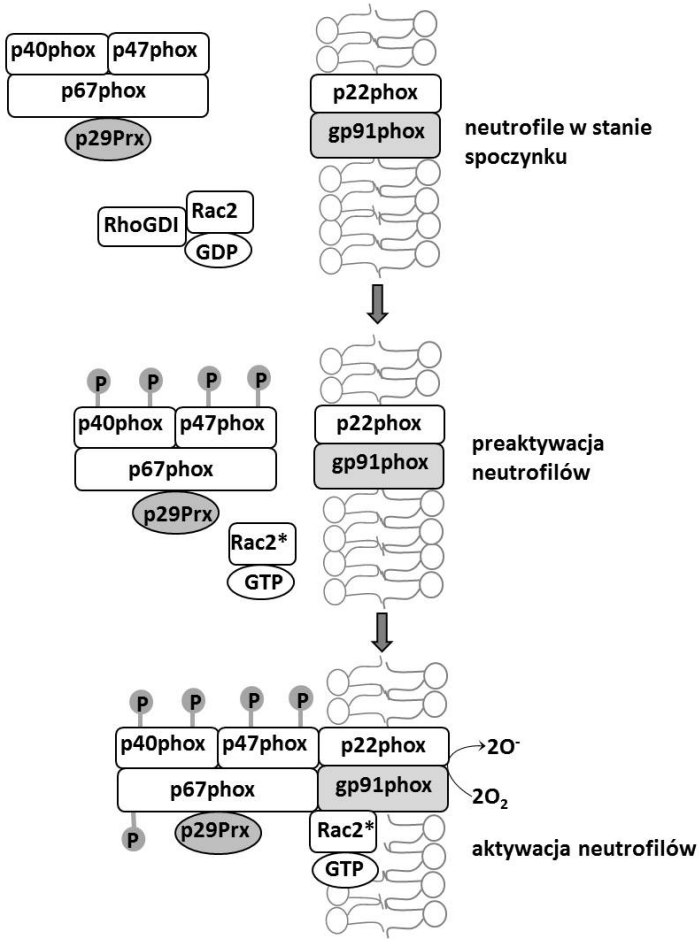
PREAKTYWACJA OKSYDAZY NADPH

Jedną z podstawowych reakcji biochemicznych inicjowanych podczas preaktywacji jest częściowa fosforylacja niektórych podjednostek oksydazy NADPH, która katalizuje szybkie wytwarzanie reaktywnego anionorodnika ponadtlenkowego (O_2^-) [8, 17].

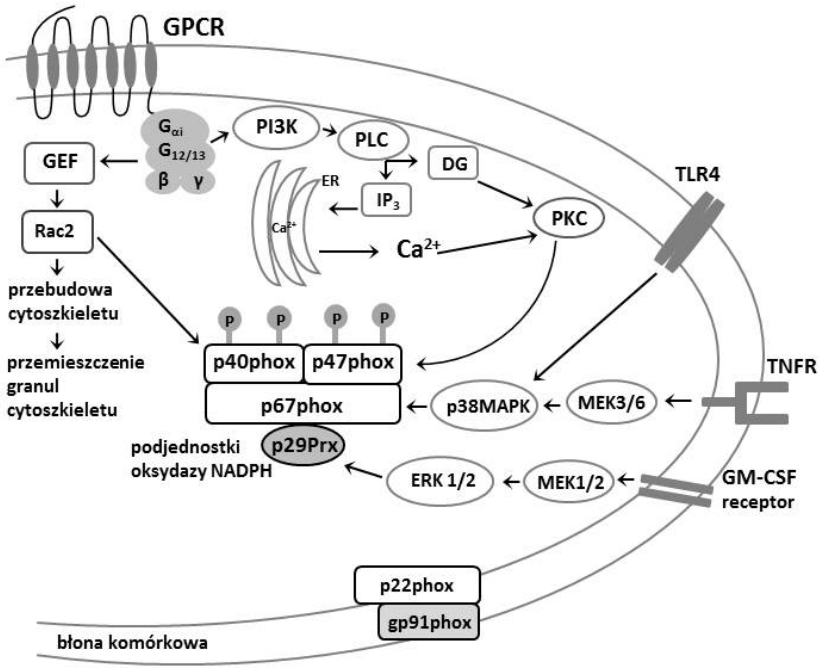
Oksydaza NADPH składa się z flawocytochromowej części katalitycznej (złożonej z podjednostek $p22^{phox}$ i $gp91^{phox}$/NOX2 tworzących cytochrom b_{558}, oraz małego białka G – Rap1A) ulokowanej w błonach ziarnistości komórkowych i w błonie komórkowej oraz podjednostek cytozolowych: $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$, małego białka G – Rac2, Cdc42 i peroksyredoksyny p29 [18, 28, 65]. Podjednostka $p22^{phox}$ pełni funkcję właściwej oksydazy, natomiast podjednostka $gp91^{phox}$ funkcjonuje jak kanał dla jonów H^+. W regulacji aktywności oksydazy biorą udział: białko $p40^{phox}$ oraz GTP-aza (Rac1/2). W nieaktywowanych neutrofilach podjednostki oksydazy NADPH pozostają rozdzielone i enzym jest nieaktywny. Preaktywacja wprowadza neutrofile w „stan gotowości"; następuje przemieszczenie podjednostek oksydazy NADPH w kierunku błony komórkowej i przygotowanie ich do szybkiego utworzenia aktywnego kompleksu enzymatycznego; przy czym na tym etapie nie obserwuje się wytwarzania ROS (ryc.2). Inicjacja sygnalizacji następuje po związaniu czynnika preaktywującego z receptorem (zwykle GPCR).

Najważniejszą podjednostką oksydazy NADPH jest $p47^{phox}$. Fragment C-końcowy podjednostki $p47^{phox}$ zawiera wiele potencjalnych miejsc fosforylacji obejmujących seryny rejonu sekwencji aminokwasowej 303-379. Fosforylacja tej podjednostki jest kluczowym etapem aktywacji kompleksu enzymatycznego. W warunkach *in vitro* podjednostka $p47^{phox}$ jest fosforylowana przez szereg enzymów, między innymi PKC, PKA (kinaza białkowa A), ERK1/2 (ERK1 (p44) lub ERK2 (p42); kinaza zależna od sygnału zewnątrzkomórkowego występująca w dwóch izoformach), p38 MAPK, Akt (kinaza białkowa B), IRAK-4 (kinaza związana z receptorem dla TNF), Src (kinaza serynowo-treoninowa) [17, 50]. Podczas preaktywacji inicjowanej przez cytokiny prozapalne takie jak GM-CSF i TNF-α dochodzi

jedynie do częściowej fosforylacji podjednostki p47^{phox}. GM-CSF indukuje aktywację kinazy ERK1/2, podczas gdy TNF-α aktywuje kinazę p38 MAPK [5, 6, 14, 52]. Obie wymienione kinazy fosforylują Ser^{345} z podjednostki p47^{phox} oksydazy NADPH (ryc. 3). Ostatnie badania wykazały, że GM-CSF może także aktywować kinazę JAK2 (kinaza Janusa 2), która prawdopodobnie pełni funkcje regulacyjne. U pacjentów z chorobami mieloproliferacyjnymi, u których stwierdzono mutację JAK2 V617F obserwowano zależną od kinazy JAK2 hiperaktywację oksydazy NADPH [31].



RYCINA 2. Preaktywacja oksydazy NADPH
FIGURE 2. Priming of NADPH oxidase



RYCINA 3. Szlaki sygnalizacyjne uruchamiane podczas preaktywacji neutrofilów do wybuchu tlenowego (GEF – białko zaangażowane w wymianę GDP na GTP, aktywujące małe białka G, MEK – aktywator kinazy ERK, DG – diacyloglicerol, IP_3 - trifosforan inozytolu)
FIGURE 3. Signaling pathways during neutrophil priming to oxidative burst (GEF – guanine nucleotid exchange factor, MEK – ERK activator kinase, DG – diacylglycerol, IP_3 – *inositol* 1,4,5-trisphosphate)

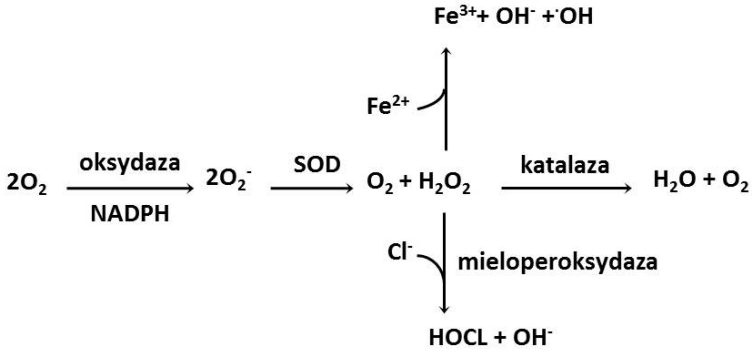
TNF-α aktywuje także cytozolową izomerazę peptydylowo-prolylową Pin1, która wiąże się z ufosforylowaną Ser^{345} podjednostki $p47^{phox}$, co indukuje zmiany konformacyjne ułatwiające fosforylację innych miejsc w podjednostce $p47^{phox}$ przez kinazę białkową C [5]. Aktywacja izomerazy Pin1 zachodzi równolegle z egzocytozą pęcherzyków wydzielniczych i ziarnistości żelatynazowych i jest konieczna do preaktywacji neutrofilów przez TNF-α [52]. Poziom fosforylacji podjednostki $p47^{phox}$ jest decydujący dla jej przemieszczenia do błony komórkowej. Jednym z najsilniej działających na podjednostkę $p47^{phox}$ czynników preaktywujących jest ester forbolu (PMA). Wykazano, że indukuje on fosforylację $p47^{phox}$ w 8-9 miejscach prawdopodobnie przez białkową kinazę C [5]. Z kolei PAF w ogóle nie inicjuje fosforylacji $p47^{phox}$, natomiast inicjuje fosforylację podjednostek $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ i Rac2 [6]. LPS, jeden z lepiej poznanych czynników preaktywujących neutrofile, wywołuje fosforylację i translokację $p47^{phox}$, natomiast nie wpływa na pozosta-

łe podjednostki oksydazy NADPH [13]. Sam LPS w niskich stężeniach (≤ 5 ng/ml) nie preaktywuje neutrofilów. Dopiero związanie LPS z białkiem nośnikowym LBP (białko wiążące lipopolisacharyd) obecnym w surowicy umożliwia przyłączenie się kompleksu LPS-LBP do ko-receptora CD14 i przeniesienie go na kompleks receptorowy TLR4/MD2 [59, 75] oraz indukcję sygnalizacji, w której kluczową rolę odgrywa kinaza p38 MAPK [58, 85]. Kolejnym czynnikiem indukującym fosforylację podjednostki $p47^{phox}$ jest zymosan, składnik ściany komórkowej *Saccharomyces cerevisiae*. Zymosan wiąże się z receptorem TLR2 i dektyną 1 na powierzchni neutrofilów i indukuje fosforylację trzech seryn w podjednostce $p47^{phox}$ (Ser^{315}, Ser^{328}, Ser^{345}), a także aktywację białka Rac2 za pośrednictwem kinaz PI3K, p38 MAPK i PKC [50]. Ufosforylowana podjednostka $p47^{phox}$ ulega przemieszczeniu do błony komórkowej, gdzie przyłącza się do flawocytochromu b_{558} [87]. Z kolei interleukina 8 działa w dwojaki sposób, w pierwszych trzech minutach zwiększa zależną od Btk (kinaza tyrozynowa Brutona) i ERK1/2 fosforylację $p47^{phox}$ oraz przemieszczenie się flawocytochromu b_{558}, $p47^{phox}$ i Rac2 do błony komórkowej; natomiast po około 15 minutach ekspozycji zwiększa zależną od Btk i ERK1/2 fosforylację podjednostki $p67^{phox}$ i jej przemieszczenie do błony [29]. Interleukina 18 zwiększa fosforylację p38 MAPK [19, 84] oraz indukuje fosforylację kinazy $p125^{FAK}$ (kinaza płytek przylegania, FAK) zaangażowanej w przebudowę cytoszkieletu, ale podobnie do PAF nie indukuje fosforylacji podjednostki $p47^{phox}$, ani jej translokacji do błony pomimo zwiększenia wybuchu tlenowego po ekspozycji na fMLP [19]. Nowym czynnikiem preaktywującym neutrofile okazał się związek CL097, będący pochodną syntetycznego związku imidazolowego R848. Po związaniu z receptorem TLR7/8 stymuluje on fosforylację podjednostki $p47^{phox}$ w trzech miejscach (Ser^{345}, Ser^{328} i Ser^{315}) za pośrednictwem kinaz p38 MAPK, ERK1/2, PKC i izomerazy Pin1 [49]. Wydaje się, że podjednostka $p47^{phox}$ pełni kluczową rolę w aktywacji oksydazy NADPH. Ostatnie badania wykazały, że fragment C-końcowy $p47^{phox}$ odpowiada za autoinhibicję tej podjednostki, a fosforylacja Ser^{379} pełni funkcję „przełącznika" inicjującego zmiany konformacyjne umożliwiające przyłączenie podjednostki $p22^{phox}$ do $p47^{phox}$ [53].

W przeciwieństwie do podjednostki $p47^{phox}$, podjednostka $p67^{phox}$, której rolą jest prawdopodobnie regulacja katalitycznej aktywności cytochromu b_{558} jest konstytutywnie fosforylowana w neutrofilach będących w stanie spoczynku. W procesie tym uczestniczy kinaza ERK1/2; a antagonistą tego procesu jest fosfataza PP1/2A (białkowa fosfataza-2A). Stymulacja komórek przez PMA i fMLP zwiększa poziom fosforylacji podjednostki $p67^{phox}$ [11].

Pełna aktywacja oksydazy NADPH następuje po związaniu czynnika aktywującego neutrofile z receptorem. Częściowo ufosforylowane podczas preaktywacji, cytozolowe podjednostki oksydazy NADPH podlegają dalszej fosforylacji i łączą się z podjednostkami błonowymi. Następuje przyłączenie Rac2 do podjednostki $p67^{phox}$. W pełni aktywny kompleks oksydazy NADPH katalizuje powstanie anionorodnika ponadtlenkowego w wyniku przeniesienia elektronu z NADPH na tlen czą-

steczkowy. Z anionorodnika ponadtlenkowego powstaje nadtlenek wodoru w reakcji katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD). Większość powstającego nadtlenku wodoru w neutrofilach ulega przekształceniu przez mieloperoksydazę (MPO) w kwas podchlorawy, który jest najbardziej bakteriobójczym utleniaczem. Kwas podchlorawy reagując z aminami powoduje powstanie chloramin. Ponadto w neutrofilach powstają wysoce reaktywne: tlen singletowy ($^1O_2$) oraz z udziałem jonów żelazawych rodniki hydroksylowe (·OH) (ryc. 4) [60].



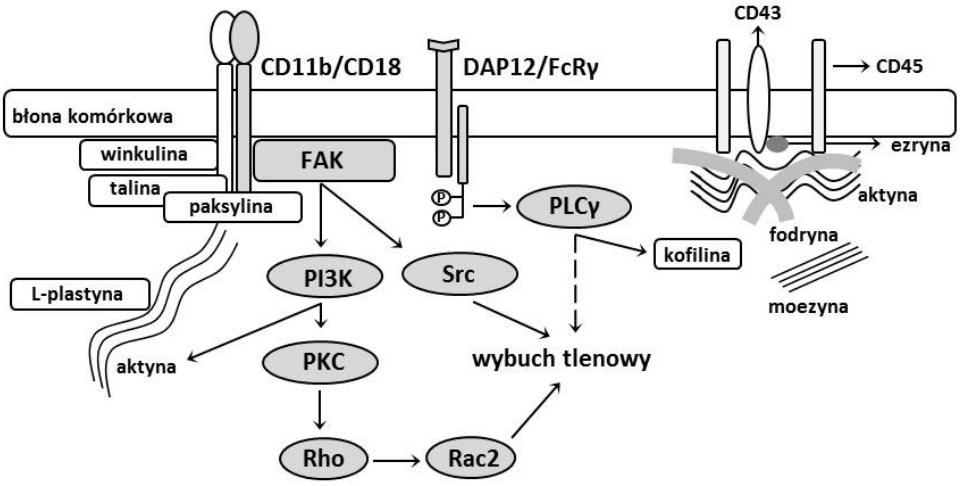
RYCINA 4. Schemat powstawania reaktywnych form tlenu w neutrofilach
FIGURE 4. Scheme of ROS production in neutrophil

BŁONA KOMÓRKOWA I CYTOSZKIELET PODCZAS PREAKTYWACJI

Preaktywacji towarzyszą zmiany w obrębie cytoszkieletu, które zapoczątkowują zmiany morfologiczne konieczne do adhezji oraz fagocytozy. Białka cytoszkieletowe wiążą się z podjednostkami oksydazy NADPH i umożliwiają im przemieszczenie się w kierunku błony komórkowej. Istotną rolę pełni tutaj F-aktyna, której przegrupowanie jest związane z preaktywacją oksydazy NADPH i angażuje fosfolipazę C, białkową kinazę C oraz GTPazę Rho [4]. Moezyna i F-aktyna wiążą się z podjednostkami $p47^{phox}$ i $p40^{phox}$ oksydazy NADPH, natomiast kofilina z podjednostką $p67^{phox}$ [65]. Aktyna i fodryna przemieszczają się w pobliże błony komórkowej. Fodryna przeplatająca się z włóknami aktyny zostaje zakotwiczona na fosfatazie błonowej (CD45), której ilość na powierzchni błony komórkowej wzrasta podczas preaktywacji [69]. Z kolei na powierzchni komórki dochodzi do przemieszczenia integryn i indukcji związanej z nimi sygnalizacji. Obserwowano zwiększenie ilości β2 integryn CD11b/CD18 (Mac-1) na powierzchni neutrofilów w wyniku działania

czynników preaktywujących takich jak: TNF-α [56, 77, 81], IL-8 [19, 47] czy PAF [27, 74]. TNF-α dodatkowo wpływał na zwiększenie migracji neutrofilów [56, 77] indukując sygnalizację z udziałem kinaz ERK1/2 oraz PI3K i p38 MAPK.

Wymienione powyżej czynniki preaktywujące inicjują sygnalizację, w której kluczową rolę odgrywa kinaza 3 fosfatydyloinozytolu (PI3K). PI3K aktywuje L-plastynę, białko, które wpływając na filamenty aktynowe i grupowanie się integryn modyfikuje aktywność kinaz lub fosfataz regulujących z kolei aktywność integryn. Ponadto PI3K aktywuje kinazę białkową C i w konsekwencji białko Rho, które bierze udział w adhezji, a także wpływa na cytohezynę 1, cytoplazmatyczne białko regulujące adhezję [79, 86]. Ostatnie badania wykazały, że białko Rho może także pełnić rolę negatywnego regulatora preaktywacji hamując ten proces za pośrednictwem formin [32]. W sygnalizacji inicjowanej podczas preaktywacji istotną rolę odgrywają także kinazy z rodziny Src i szereg białek adaptorowych, w tym DAP12, SLP-76 (ryc. 5) [26, 28, 63]. Białka wiążące aktynę: winkulina, talina i paksylina ulegają fosforylacji z udziałem kinaz Src i FAK i pełnią funkcję białek adaptorowych pomiędzy aktyną a efektorami szlaków sygnalnych [22, 25, 30].



RYCINA 5. Sygnalizacja inicjowana przez integryny i zmiany w obrębie cytoszkieletu podczas preaktywacji neutrofilów (FcRγ – receptor dla regionu Fc przeciwciał, DAP12 – białko adaptorowe zawierające motyw przekazujący sygnały aktywujące – ITAM, CD43 – sjaloforyna)

FIGURE 5. Signaling initiated by integrins and cytoskeleton remodeling during neutrophil priming (FcRγ – Fc gamma receptor, DAP12 – immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) – con–taining adaptor protein, CD43 – sialophorin)

W preaktywacji rolę odgrywają także lipidowe cząsteczki pośredniczące, takie jak leukotrieny (szczególnie LTB_4) czy kwas arachidonowy (AA). LTB4 jest czynnikiem chemotaktycznym i preaktywuje neutrofile do adhezji do śródbłonka [20]. Dokładny mechanizm działania wyżej wymienionych związków pozostaje nieznany. W sygnalizacji indukowanej przez te związki rolę odgrywają receptory GPCR oraz kinazy MAPK. LTB4 aktywuje kinazę ERK1/2 i wywołuje przemieszczenie białka Rac2. Ponadto lipidowe mediatory mogą aktywować białkową kinazę C (PKC) i kinazę 3-fosfatydyloinozytolu.

EGZOCYTOZA GRANUL PODCZAS PREAKTYWACJI NEUTROFILÓW

Ziarnistości neutrofilowe powstają we wczesnych etapach różnicowania się neutrofilów z multipotencjalnej komórki macierzystej szpiku kostnego. Dojrzałe neutrofile zawierają granule: azurofilne (pierwszorzędowe), specyficzne (drugorzędowe) i żelatynazowe (trzeciorzędowe) (tab. 1). Oprócz ziarnistości neutrofile zawierają także pęcherzyki sekrecyjne (zwane także fosfasomami), które powstają na drodze endocytozy i magazynują białka błonowe m.in. β2 integryny, receptor dla składnika dopełniacza 1 (CR1), receptory dla fMLP, a także fosfatazę alkaliczną [21, 45, 46, 55].

Preaktywacja związana jest z częściowym uwolnieniem zawartości granul trzeciorzędowych magazynujących m.in. składniki oksydazy NADPH, a następnie drugorzędowych, co prowadzi do zwiększenia ilości błonowych receptorów i cząsteczek sygnalizacyjnych. Degranulacja ziarnistości pierwszorzędowych następuje w wyniku fagocytozy bakterii, jest przejawem pełnej aktywacji komórek i podlega regulacji ze strony GTP-az: Rac2 [54] i Rab27a [33]. Dla egzocytozy granul istotny jest wzrost stężenia wapnia w komórce, a w szlakach sygnalnych regulujących ten proces główną rolę odgrywają PI3K oraz PLC (ryc. 6) [62].

Stymulacja neutrofilów za pomocą LPS powoduje translokację flawocytochromu b_{558} z granul specyficznych do błony komórkowej [13] oraz receptora FPR1 (receptor dla fMLP) z granul trzeciorzędowych [1, 9], a także podjednostki $G_{i\alpha 2}$ do błony komórkowej [34]. Wzrost ilości receptorów CD35 (receptor dla składnika dopełniacza) i CD66b (CEACAM8, receptor dla galektyny 3) w błonie komórkowej po stymulacji za pomocą LPS i TNF-α świadczy o zaangażowaniu także pęcherzyków sekrecyjnych w preaktywację neutrofilów [78]. TNF-α poza zwiększeniem ilości receptorów dla fMLP na powierzchni błony inicjuje degranulację ziarnistości specyficznych i żelatynazowych [74] oraz indukuje równolegle zwiększenie ilości CD11b i CD66b oraz obniżenie ilości selektyny CD62L [81].

Granule azurofilne (pierwszorzędowe)	Granule specyficzne (drugorzędowe)	Granule żelatynazowe (trzeciorzędowe)
o mieloperoksydaza (MPO) o kwaśne hydrolazy o elastaza o białka przeciwbakteryjne: α-defensyna, seprocydyna, azurocydyna, białko zwiększające przepuszczalność błon bakteryjnych – BPI o β-glukuronidaza, o β-glicerofosfataza, o proteinaza 3, o sialidaza, o CD63, CD68	o receptory dla białek macierzy międzykomórkowej (fibronektyny, witronektyny, lamininy, fibrynogenu) o metaloproteazy (MMP): kolagenoza i żelatynaza, o β_2-mikroglobulina o laktoferyna, o histaminaza, o lizozym o Rap1, Rap2 o leukolizyna o CD11b/CD18 o CD15, CD67, CD66	o cytochrom b_{558} o żelatynaza, o laktoferyna, o lizozym o białka adhezyjne (m.in. CD11b/CD18) o receptor dla fMLP

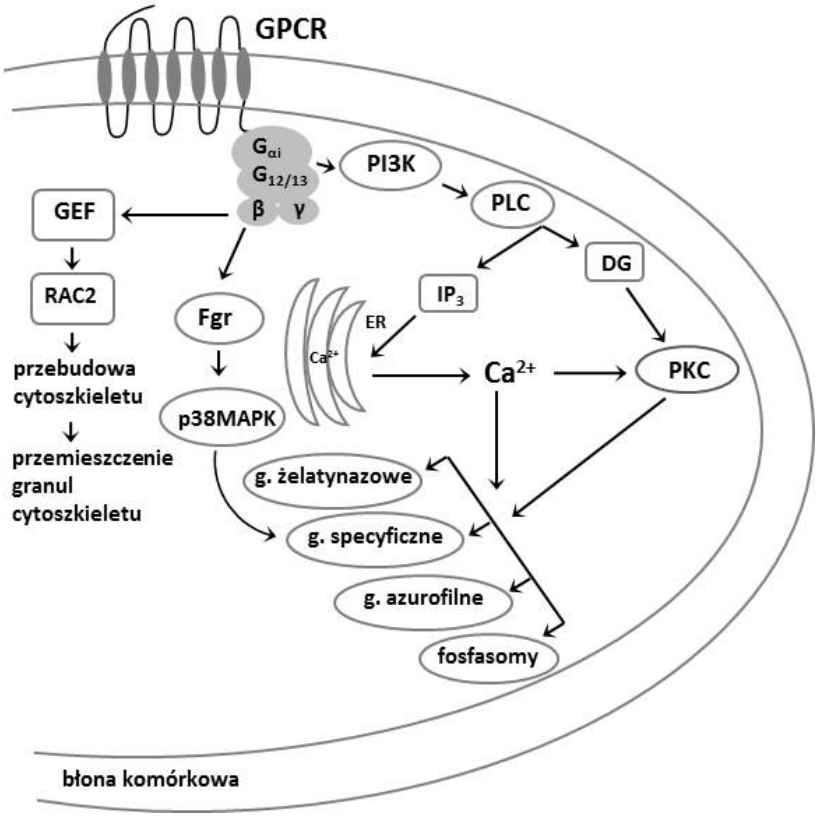
TABELA 1. Najważniejsze składniki granul neutrofilowych
TABLE 1. Content of neutrophil granules

Interleukiny IL-8 i IL-18 indukują degranulację z wydzieleniem elastazy [39, 84]. Natomiast PAF powoduje zwiększenie ilości receptorów CR1, alkalicznej fosfatazy oraz integryn CD11b/CD18 w wyniku degranulacji pęcherzyków sekrecyjnych [28, 74]. Integryny także inicjują ścieżkę sygnalną prowadzącą do degranulacji. Pośredniczy w niej kinaza Pyk2. Badania na myszach wykazały, że brak kinazy Pyk2 skutkuje obniżoną fosforylacją paksyliny i czynnika wymiany nukleotydów Vav, a co za tym idzie obniżoną zdolnością do degranulacji [35].

Wykazano, że egzocytoza pęcherzyków sekrecyjnych będących magazynem dla podjednostek oksydazy NADPH pełni znaczącą rolę w aktywacji wybuchu tlenowego we wnętrzu fagosomu, ale nie wpływa na aktywację oksydazy NADPH w błonie komórkowej. W egzocytozie ziarnistości żelatynazowych oraz specyficznych bierze udział białko SNAP-23; jego zablokowanie skutkowało zahamowaniem fuzji błon otaczających ziarnistości i obniżeniem wewnątrzkomórkowego wybuchu tlenowego o ponad 60 procent. Jednocześnie hamowanie wybuchu tlenowego w fagosomie nie miało wpływu na kinazy p38 MAPK i ERK1/2 aktywowane przez fMLP, co prowadziło do zewnątrzkomórkowego wybuchu tlenowego [52, 76].

Ważnym czynnikiem regulującym degranulację ziarnistości drugorzędowych, żelatynazowych oraz pęcherzyków sekrecyjnych jest prozapalne białko wiążące wapń: C1009A obecne w cytozolu neutrofilów. Białko C1009A odpowiada za wzrost ilości cząsteczek CD35 i CD66b na powierzchni neutrofilów i indukuje fosforylację kinaz p38 MAPK i ERK1/2 [66].

Ponieważ w odpowiedzi na czynniki preaktywujące nie dochodzi do całkowitego uwolnienia enzymów proteolitycznych (głównie zawartych w granulach pierwszorzędowych), wydaje się, że preaktywacja nie powoduje zniszczenia otaczających miejsce infekcji zdrowych tkanek.



RYCINA 6. Szlaki sygnalne uruchamiane podczas degranulacji (Fgr – kinaza z rodziny Src, GEF – białko zaangażowane w wymianę GDP na GTP, aktywujące małe białka G)
FIGURE 6. Signaling pathways during degranulation (Fgr – Src family kinase, GEF – guanine nucleotide exchange factor)

ROLA PREAKTYWACJI NEUTROFILÓW *IN VIVO*

Preaktywacja neutrofilów do wybuchu tlenowego chroni organizm i sprzyja szybszej eliminacji patogenów dzięki wzmożonej odpowiedzi neutrofilów na czynniki aktywujące. Preaktywację neutrofilów do wybuchu tlenowego *in vivo* potwierdzono w eksperymentach podając ochotnikom dożylnie TNF-α i GM-CSF. Po podaniu wymienionych cytokin obserwowano zwiększoną produkcję nadtlenku wodoru po ekspozycji na fMLP [38].

Preaktywacja neutrofilów do wybuchu tlenowego i degranulacji może sprzyjać rozwojowi niektórych schorzeń. Liczne doniesienia literaturowe wskazują na udział nadmiernie preaktywowanych neutrofilów w takich chorobach jak: zespół ostrej niewydolności oddechowej [71], reumatoidalne zapalenie stawów [36, 82], ostre uszkodzenie nerek [39] czy arterioskleroza [2, 68]. Wskazuje się także na udział preaktywowanych neutrofilów w nekrotycznym uszkodzeniu tkanek w przebiegu wielu chorób, w tym niedokrwistości sierpowatokrwinkowej czy retinopatii cukrzycowej [64]. Poza tym w eksperymentach na królikach wykazano, że dożylne podanie kolejno LPS i fMLP powodowało zależne od neutrofilów uszkodzenie płuc.

Neutrofile dysponują mechanizmami zabijania pochłoniętych drobnoustrojów, jednak w patologicznych sytuacjach mogą niszczyć również zdrowe tkanki. Jak wspomniano powyżej rodniki tlenowe powstające w wyniku wybuchu tlenowego mogą uszkadzać białka i lipidy komórkowe oraz powodować mutacje w materiale genetycznym. Dodatkowo enzymy uwalniane podczas degranulacji mogą uszkadzać tkanki poprzez proteolityczną degradację macierzy międzykomórkowej. Uwalnianie ROS może być potęgowane przez wysoki poziom cytokin prozapalnych (np. TNF-α i GM-CSF) w miejscu zapalnym. Wykazano, że neutrofile izolowane z mazi stawowej osób chorych na reumatoidalne zapalenie stawów były już preaktywowane do wybuchu tlenowego i wykazywały częściową fosforylację podjednostki $p47^{phox}$ oraz aktywację kinaz ERK1/2 i p38 MAPK [12, 18].

DE-PREAKTYWACJA NEUTROFILÓW

Neutrofile wykazują zdolność do przejścia ze stanu preaktywacji do stanu spoczynkowego (ang. *depriming*), co wiąże się również z ich powrotem do krwioobiegu. De-preaktywację neutrofilów *in vitro* jako pierwsza potwierdziła w badaniach Kitchen i współpracownicy [40]. Wykazała ona, że preaktywacja neutrofilów za pomocą PAF jest procesem w pełni odwracalnym, podczas którego w ciągu 30 minut komórki stają się niespolaryzowane i zmniejsza się na ich powierzchni ilość inte-

gryn CD11b/CD18; co więcej komórki te były zdolne do ponownej preaktywacji pod wpływem PAF lub TNF-α.

Badania z użyciem neutrofilów od osób chorych z ostrym uszkodzeniem płuc jak i zespołem ostrej niewydolności oddechowej (ang. *Acute Respiratory Distress Syndrome,* ARDS), a także chorych na nieswoiste zapalenie jelit (ang. *Inflammatory Bowel Diseases*, IBD) dowodzą, że niezdolność neutrofilów do de-preaktywacji może przyczyniać się do gorszego przebiegu niektórych schorzeń, prowadząc do uszkadzania narządów w wyniku nagromadzania się preaktywowanych i aktywowanych neutrofilów [67, 71]. Opierając się o matematyczny model preaktywacji neutrofilów Summers i współpracownicy [70] stwierdzili, że wszystkie preaktywowane neutrofile wykazują zdolność do de-preaktywacji. Natomiast badania z użyciem znakowanych neutrofilów wykazały, że naczynia krwionośne płuc mogą stanowić kompartment, w którym neutrofile ulegają de-preaktywacji. W eksperymentach przeprowadzonych przez Summers i współpracowników [72, 73] po dożylnym podaniu zdrowym osobom znakowanych i preaktywowanych *ex vivo* za pomocą PAF neutrofilów, 100 procent komórek zostało zatrzymanych w płucach na około 40 minut, po czym około 90 procent neutrofilów powróciło do puli krążącej. Stąd de-preaktywacja wydaje się spełniać istotną rolę w kontrolowaniu funkcji i zapobieganiu nadaktywności neutrofilów powracających do krwioobiegu, ale jej dokładny mechanizm pozostaje nieznany. Jak dotąd nie wiadomo również jakie czynniki inicjują de-preaktywację neutrofilów i jakie szlaki sygnalne kontrolują ten proces.

PODSUMOWANIE

Preaktywacja neutrofilów w istotny sposób wpływa na ich bakteriobójcze właściwości. Z jednej strony potęguje aktywację neutrofilów i przyczynia się do zwiększonego wybuchu tlenowego oraz degranulacji. Z drugiej strony preaktywacja chroni organizm przed nadaktywnością neutrofilów i uszkodzeniem tkanek. Na poziomie molekularnym preaktywacja regulowana jest przez szereg skomplikowanych szlaków sygnalnych indukowanych aktywacją różnych receptorów (w większości GPCR). W preaktywacji do wybuchu tlenowego kluczową rolę pełni podjednostka $p47^{phox}$ oksydazy NADPH, której fosforylacja jest etapem decydującym o mobilizacji podjednostek cytozolowych i połączeniu ich z podjednostkami błonowymi w aktywny kompleks. Doniesienia literaturowe wskazują na odwracalność preaktywacji i na gorszy przebieg niektórych schorzeń w przypadku zaburzeń de-preaktywacji. Poznanie mechanizmu de-preaktywacji może przyczynić się do opracowania nowych strategii terapeutycznych w leczeniu np. reumatoidalnego zapalenia stawów czy nieswoistego zapalenia jelit.

LITERATURA

[1] Almkvist J, Fäldt J, Dahlgren C, Leffler H, Karlsson A. Lipopolysaccharide-induced gelatinase granule mobilization primes neutrophils for activation by galectin-3 and formylmethionyl-Leu-Phe. *Infect Immun* 2001; **69**: 832-837.

[2] Baetta R, Corsini A. Role of polymorphonuclear neutrophils in atherosclerosis: Current state and future perspectives. *Atherosclerosis* 2010; **210**: 1-13.

[3] Bekkering S, Torensma R. Another look at the life of a neutrophil. *World J Hematol* 2013; **2**: 44-58.

[4] Bengtsson T, Orselius K, Wetterö J. Role of the actin cytoskeleton during respiratory burst in chemoattractant-stimulated neutrophils. *Cell Biol Int* 2006; **30**: 154-163.

[5] Boussetta T, Gougerot-Pocidalo MA, Hayem G, Ciappelloni S, Raad H, Arabi Derkawi R, Bournier O, Kroviarski Y, Zhou XZ, Malter JS, Lu PK, Bartegi A, Dang PM, El-Benna J. The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF-alpha-induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils. *Blood* 2010; **116**: 5795-5802.

[6] Brown GE, Stewart MQ, Bissonnette SA, Elia AE, Wilker E, Yaffe MB. Distinct ligand-dependent roles for p38 MAPK in priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem* 2004; **279**: 27059-7068.

[7] Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet* 2006; **368**: 157-169.

[8] Bylund J, Brown KL, Movitz C, Dahlgren C, Karlsson A. Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: how, where, and what for? *Free Radic Biol Med* 2010; **49**:1834-1845.

[9] Bylund J, Karlsson A, Boulay F, Dahlgren C. Lipopolysaccharide-induced granule mobilization and priming of the neutrophil response to *Helicobacter pylori* peptide Hp (2-20), which activates formyl peptide receptor-like 1. *Infect Immun* 2002; **70**: 2908-2914.

[10] Condliffe AM, Kitchen E, Chilvers ER. Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. *Clin Sci* 1998; **94**: 461-471.

[11] Dang PM, Raad H, Derkawi RA, Boussetta T, Paclet MH, Belambri SA, Makni-Maalej K, Kroviarski Y, Morel F, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. The NADPH oxidase cytosolic component p67phox is constitutively phosphorylated in human neutrophils: Regulation by a protein tyrosine kinase, MEK1/2 and phosphatases 1/2A. *Biochem Pharmacol* 2011; **82**: 1145-1152.

[12] Dang PM, Stensballe A, Boussetta T, Raad H, Dewas C, Kroviarski Y, Hayem G, Jensen ON, Gougerot-Pocidalo Ma, El-Benna J. A specific p47phox-serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J Clin Invest* 2006; **116**: 2033-2043.

[13] Deleo FR, Renee J, Mccormick S, Nakamura M, Apicella M, Weiss JP, Nauseef WM. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J Clin Invest* 1998; **101**: 455-463.

[14] Dewas C, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. TNF – induces phosphorylation of p47(-phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 2003; **171**, 4392-4398.

[15] Dimasi D, Sun WY, Bonder CS. Neutrophil interactions with the vascular endothelium. *Internat Immunopharmacol* 2013; **17**: 1167-1175.

[16] El Kebir D, Filep JG. Role of neutrophil apoptosis in the resolution of inflammation. *ScientificWorldJournal* 2010; **10**:1731-1748.

[17] El-Benna J, Chan Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, Marie JC, Braut-Boucher F. p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med* 2009; **41**: 217-225.

[18] El-Benna J, My-Chan Dang P, Gougerot-Pocidalo M. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation; role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol* 2008; **30**: 279-289.

[19] Elbim C, Guichard C, Dang Pm, Fay M, Pedruzzi E, Demur H, Pouzet C, El Benna J, Gougerot-Pocidalo Ma. Interleukin-18 primes the oxidative burst of neutrophils in response to formyl-peptides: role of cytochrome b558 translocation and N-formyl peptide receptor endocytosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; **12**: 436-446.

[20] Eun JC, Moore EE, Banerjee A, Kelher MR, Khan SY, Elzi DJ, Mclaughlin NJ, Silliman CC. Leukotriene b4 and its metabolites prime the neutrophil oxidase and induce proinflammatory activation of human pulmonary microvascular endothelial cells. *Shock* 2011; **35**: 240-244.

[21] Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 2003; **5**: 1317-1327.

[22] Fernandez R, Boxer LA, Suchard SJ. Beta2 integrins are not required for tyrosine phosphorylation of paxillin in human neutrophils. *J Immunol* 1997; **159**: 5568-5575.

[23] Filina YV, Safronova VG, Gabdoulkhakova AG. Small G-proteins Ras, Rac and Rho in the regulation of the neutrophil respiratory burst induced by formyl peptide. *Biochem (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol* 2012, **6**: 67-74.

[24] Fu H, Bylund J, Karlsson A, Pellmé S, Dahlgren C. 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. *Immunology* 2004; **112**: 201-210.

[25] Fuortes M, Jin WW, Nathan C. Beta 2 integrin-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin in human neutrophils treated with tumor necrosis factor. *J Cell Biol* 1994; **127**, 1477-1483.

[26] Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol* 2013;**17**: 638-650.

[27] Gay JC. Mechanism and regulation of neutrophil priming by platelet-activating factor. *J Cell Physiol* 1993; **156**: 189-197.

[28] Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ, Rittinger K. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell* 2003; **113**: 343-355.

[29] Guichard C, Pedruzzi E, Dewas C, Fay M, Pouzet C, Bens M, Vandewalle A, Ogier-Denis E, Gougerot-Pocidalo MA, Elbim C. Interleukin-8-induced priming of neutrophil oxidative burst requires sequential recruitment of NADPH oxidase components into lipid rafts. *J Biol Chem* 2005; **280**: 37021-37032.

[30] Hamasaki K, Mimura T, Morino N, Furuya H, Nakamoto T, Aizawa S, Morimoto C, Yazaki Y, Hirai H, Nojima Y. Src kinase plays an essential role in integrin-mediated tyrosine phosphorylation of Crk associated substrate p130Cas. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **222**: 338-343.

[31] Hurtado-Nedelec M, Csillag-Grange MJ, Boussetta T, Belambri SA, Fay M, Cassinat B, Gougerot-Pocidalo MA, Dang PM, El-Benna J. Increased reactive oxygen species production and p47phox phosphorylation in neutrophils from myeloproliferative disorders patients with JAK2 (V617F) mutation. *Haematologica* 2013; **98**: 1517-1524.

[32] Jennings RT, Strengert M, Hayes P, El-Benna J, Brakebusch C, Kubica M, Knaus UG. RhoA determines disease progression by controlling neutrophil motility and restricting hyperresponsiveness. *Blood* 2014; **123**: 3635-3645.

[33] Johnson JL, Brzezinska AA, Tolmachova T, Munafo DB, Ellis BA, Seabra MC, Hong H, Catz SD. Rab27a and Rab27b regulate neutrophil azurophilic granule exocytosis and NADPH oxidase activity by independent mechanisms. *Traffic* 2010; **11**: 533-547.

[34] Kabanov DS, Prokhorenko IR. Involvement of toll-like receptor 4 and Fc receptors gamma in human neutrophil priming by endotoxins from Escherichia coli. *Biochemistry (Mosc)* 2013; **78**: 185-193.

[35] Kamen LA, Schlessinger J, Lowell CA. Pyk2 is required for neutrophil degranulation and host defense responses to bacterial infection. *J Immunol* 2011; **186**:1656-1665.

[36] Kaplan MJ. Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther* 2013; **15**: 219

[37] Keshari RS, Jyoti A, Dubey M, Kothari N, Kohli M, Bogra J, Barthwal MK, Dikshit M. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. *PLoS One.* 2012; **7**: e48111.

[38] Khwaja A, Carver JE, Linch DC. Interactions of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (CSF), Granulocyte CSF, and Tumor Necrosis Factor in the Priming of the Neutrophil Respiratory Burst. *Blood* 1992; **79**: 745-753.
[39] Kinsey GR, Okusa MD. Role of leukocytes in the pathogenesis of acute kidney injury. *Crit Care* 2012, **16**: 214.
[40] Kitchen E, Rossi AG, Condliffe AM, Haslett C, Chilvers ER. Demonstration of reversible priming of human neutrophils using platelet-activating factor. *Blood* 1996; **88**: 4330-4337.
[41] Kobayashi SD, Voyich JM, Burlak C, Deleo FR. Neutrophils in the innate immune response. *Arch Immunol Ther Exp* 2005; **53**: 505-517.
[42] Koenderman L, Kanters D, Maesen B, Raaijmakers J, Lammers JW, De Kruif J, Logtenberg T. Monitoring of neutrophil priming in whole blood by antibodies isolated from a synthetic phage antibody library. *J Leukoc Biol* 2000; **68**: 58-64.
[43] Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013; **13**: 159-175.
[44] Kovach MA, Standiford TJ. The function of neutrophils in sepsis. *Curr Opin Infect Dis* 2012; **25**: 321-327.
[45] Lacy P, Eitzen G. Control of granule exocytosis in neutrophils. *Front Biosci* 2008; **13**: 5559-5570.
[46] Lacy P. Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2006; **2**: 98-108.
[47] Leung BP, Culshaw S, Gracie JA, Hunter D, Canetti CA, Campbell C, Cunha F, Liew FY, Mcinnes IB. A role for IL-18 in neutrophil activation. *J Immunol* 2001; **167**: 2879-2886.
[48] Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007; **7**: 678-89.
[49] Makni-Maalej K, Boussetta T, Hurtado-Nedelec M, Belambri SA, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. The TLR7/8 agonist CL097 primes N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated NADPH oxidase activation in human neutrophils: critical role of p47phox phosphorylation and the proline isomerase Pin1. *J Immunol* 2012; **189**: 4657-4665.
[50] Makni-Maalej K, Chiandotto M, Hurtado-Nedelec M, Bedouhene S, Gougerot-Pocidalo MA, Dang PM, El-Benna J. Zymosan induces NADPH oxidase activation in human neutrophils by inducing the phosphorylation of p47phox and the activation of Rac2: involvement of protein tyrosine kinases, PI3Kinase, PKC, ERK1/2 and p38MAPkinase. *Biochem Pharmacol* 2013; **85**: 92-100.
[51] Matoszka N, Działo J, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W. NET and NETosis-new phenomenon in immunology. *Postepy Hig Med Dosw* 2012; **66**: 437-445.
[52] Mcleish KR, Uriarte SM, Tandon S, Creed TM, Le J, Ward RA. Exocytosis of neutrophil granule subsets and activation of prolyl isomerase 1 are required for respiratory burst priming. *J Innate Immun* 2013; **5**: 277-289.
[53] Meijles DN, Fan LM, Howlin BJ, Li JM. Molecular Insights of p47phox Phosphorylation Dynamics in the Regulation of NADPH Oxidase Activation and Superoxide Production. *J Biol Chem* 2014; **289**: 22759-22770.
[54] Mitchell T, Lo A, Logan MR, Lacy P, Eitzen G. Primary granule exocytosis in human neutrophils is regulated by Rac-dependent actin remodeling. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; **295**: C1354-65.
[55] Mollinedo F. Human neutrophil granules and exocytosis molecular control. *Immunología* 2003; **22**: 340-358.
[56] Montecucco F, Steffens S, Burger F, Da Costa A, Bianchi G, Bertolotto M, Mach F, Dallegri F, Ottonello L. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1alpha) on human neutrophils through defined signalling pathways. *Cell Signal* 2008; **20**: 557-568.
[57] Naccache PH. Signalling in Neutrophils: A Retro Look. *ISRN Physiology* 2013; 1-13.
[58] Newton K, Dixit VM. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; **4**: pii: a006049.
[59] Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 2009; **458**: 1191-1195.

[60] Robinson JM. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochem Cell Biol* 2008; **130**: 281-297.
[61] Rupa J, Lewandowski K. Granulopoeza: od roli zaangażowanych genów do czynników transkrypcyjnych i cytokin. *Acta Haematol Pol* 2006; **37**: 485-504.
[62] Sato T, Hongu T, Sakamoto M, Funakoshi Y, Kanaho Y. Molecular Mechanisms of N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine-Induced Superoxide Generation and Degranulation in Mouse Neutrophils: Phospholipase D Is Dispensable. *Mol Cell Biol* 2013; **33**: 136-145.
[63] Schymeinsky J, Mócsai A, Walzog B. Neutrophil activation via beta2 integrins (CD11/CD18): molecular mechanisms and clinical implications. *Thromb Haemost* 2007; **98**: 262-273.
[64] Segel GB, Halterman MW, Lichtman MA. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *J Leukoc Biol* 2011; **89**: 359-372.
[65] Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, Mclaughlin NJD, Banerjee A, Silliman CC. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol* 2005; **78**: 1- 8.
[66] Simard JC, Girard D, Tessier PA. Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism. *J Leukoc Biol* 2010; **87**: 905-914.
[67] Singh NR, Johnson A, Peters AM, Babar J, Chilvers ER, Summers C. Acute lung injury results from failure of neutrophil de-priming: a new hypothesis. *Eur J Clin Invest* 2012; **42**: 1342-1349.
[68] Soehnlein O. Multiple Roles for Neutrophils in Atherosclerosis. *Circ Res* 2012; **110**: 875-888.
[69] Stie J, Jesaitis AJ. Reorganization of the human neutrophil plasma membrane is associated with functional priming: implications for neutrophil preparations. *J Leukoc Biol* 2007; **81**: 672-685.
[70] Summers C, Chilvers ER, Peters AM. Mathematical modeling supports the presence of neutrophil depriming in vivo. *Physiol Rep* 2014; **20**: e00241.
[71] Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* 2010; **31**: 318-324.
[72] Summers C, Singh NR, White JF, Mackenzie IM, Johnston A, Solanki C, Balan KK, Peters AM, Chilvers ER. Pulmonary retention of primed neutrophils: a novel protective host response, which is impaired in the acute respiratory distress syndrome. *Thorax* 2014; **69**: 623-629.
[73] Summers CjF, White N R, Singh IM, Mackenzie A, Johnston KK, Balan K, Peters A, Chilvers ER. Establishing the pulmonary transit time of primed and unprimed neutrophils in man. *Thorax* 2009; 64:A3
[74] Swain SD, Rohn TT, Quinn MT. Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. *Antioxid Redox Signal* 2002; **4**: 69-83.
[75] Tsukamoto H, Fukudome K, Takao S, Tsuneyoshi N, Kimoto M. Lipopolysaccharide-binding protein-mediated Toll-like receptor 4 dimerization enables rapid signal transduction against lipopolysaccharide stimulation on membrane-associated CD14-expressing cells. *Int Immunol* 2010; **22**: 271-80.
[76] Uriarte SM, Rane MJ, Luerman GC, Barati MT, Ward RA, Nauseef WM, Mcleish KR. Granule exocytosis contributes to priming and activation of the human neutrophil respiratory burst. *J Immunol* 2011; **187**: 391-400.
[77] Volk AP, Barber BM, Goss KL, Ruff JG, Heise CK, Hook JS, Moreland JG. Priming of neutrophils and differentiated PLB-985 cells by pathophysiological concentrations of TNF-α is partially oxygen dependent. *J Innate Immun* 2011; **3**: 298-314.
[78] Ward RA, Nakamura M, Mcleish KR. Priming of the neutrophil respiratory burst involves p38 mitogen-activated protein kinase-dependent exocytosis of flavocytochrome b558-containing granules. *J Biol Chem* 2000; **275**: 36713-36719.
[79] Williams MA, Solomkin Js. Integrin-mediated signaling in human neutrophil functioning. *J Leukoc Biol* 1999; **65**: 725-736.
[80] Witko-Sarsat V, Pederzoli-Ribeil M, Hirsch E, Sozzani S, Cassatella MA. Regulating neutrophil apoptosis: new players enter the game. *Trends Immunol* 2011; **32**:117-124.
[81] Wittmann S, Rothe G, Schmitz G, Fröhlich D. Cytokine upregulation of surface antigens correlates to the priming of the neutrophil oxidative burst response. *Cytometry A* 2004; **57**: 53-62.

[82] Wright HL, Moots RJ, Edwards SW. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis *Nat Rev Rheumatol* 2014; **10:** 593-601.
[83] Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)* 2010; **49**: 1618-1631.
[84] Wyman TH, Dinarello CA, Banerjee A, Gamboni-Robertson F, Hiester AA, England KM, Kelher M, Silliman CC. Physiological levels of interleukin-18 stimulate multiple neutrophil functions through p38 MAP kinase activation. *J Leukoc Biol* 2002; **72**: 401-409.
[85] Yan SR, Al-Hertani W, Byers D, Bortolussi R. Lipopolysaccharide-Binding Protein- and CD14-Dependent Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase p38 by Lipopolysaccharide in Human Neutrophils is Associated with Priming of Respiratory Burst. *Infect Immun* 2002; **70**: 4068-4074.
[86] Yang HW, Shin MG, Lee S, Kim JR, Park WS, Cho KH, Meyer T, Heo WD. Cooperative activation of PI3K by Ras and Rho family small GTPases. *Mol Cell* 2012; **47**: 281-290.
[87] Zhan Y, He D, Newburger PE, Zhou GW. p47(phox) PX domain of NADPH oxidase targets cell membrane via moesin-mediated association with the actin cytoskeleton. *J Cell Biochem* 2004; **92**: 795-809.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 11.08.14
Przyjęto: 19.11.14
Anna Pańczyszyn
Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej
Uniwersytet Opolski
ul. Kominka 6a, 45-032 Opole
tel.: 077 4016050
fax: 077 4016051
e-mail: apanczyszyn@uni.opole.pl