

# ULOGA FAGOCITA U IMUNOSNOJ OBRANI ŽIVOTINJSKOG ORGANIZMA

---

Vujnović, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2015

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:410290>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-06**



Sveučilište Josipa Jurja  
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet  
agrobiotehničkih  
znanosti Osijek**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical  
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of  
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Ivana Vujnović, apsolvant

Diplomski studij zootehnika, smjer Specijalna zootehnika

**ULOGA FAGOCITA U IMUNOSNOJ OBRANI ŽIVOTINJSKOG ORGANIZMA**

Diplomski rad

Osijek, 2015.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Ivana Vujnović, apsolvant

Diplomski studij zootehnika, smjer Specijalna zootehnika

**ULOGA FAGOCITA U IMUNOSNOJ OBRANI ŽIVOTINJSKOG ORGANIZMA**

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Marcela Šperanda, predsjednik

2. doc. dr. sc. Mislav Đidara, mentor

3. Mirela Pavić, dr. med. vet., član

Osijek, 2015.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. NESPECIFIČNA IMUNOST.....	2
3. NEUTROFILI.....	3
3.1. Građa neutrofila.....	9
3.2. Površinski receptori neutrofila.....	10
4. MIGRACIJA NEUTROFILA IZ KRVOTOKA.....	12
4.1. Promjene na endotelnim stanicama.....	12
4.2. Promjene na neutrofilima.....	13
4.3. Migracija.....	14
5. FAGOCITOZA.....	16
5.1. Aktivacija.....	17
5.2. Kemotaksija.....	17
5.3. Prianjanje i opsonizacija.....	22
5.4. Ingestija.....	24
5.5. Digestija.....	25
6. SUDBINA NEUTROFILA.....	30
7. UTJECAJ CITOKINA NA NEUTROFILE.....	32
8. ZAKLJUČAK.....	36
9. POPIS LITERATURE.....	37
10. SAŽETAK.....	41
11. SUMMARY.....	42
12. POPIS SLIKA.....	43
13. POPIS TABLICA.....	44
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA ARTICA.....	45
BASIC DOCUMENTATION CARD.....	46

# 1. UVOD

Imunosni sustav je sustav organa koji štiti organizam od napada stranih mikroorganizama (virusa, bakterija, gljivica i parazita), njihovih kemijskih tvari (toksina), kao i vlastitih izmjenjenih (tumorske stanice) i istrošenih stanica. Imunosni sustav se sastoji od organa smještenih po čitavom tijelu te stanica koje sudjeluju u imunskim reakcijama. Organi imunskog sustava su koštana srž, timus i limfni čvorovi. Razlikujemo dvije vrste imunosti: nespecifičnu (prirodenu) i specifičnu (stečenu) imunost.

Nespecifična imunost djeluje i bez prethodnoga kontakta organizma s određenim antigenom te je usmjerena protiv svih antigena koji ulaze u organizam. Ona se temelji na brojnim mehanizmima, kao što su npr. anatomske prepreke poput kože i sluznica koje pružaju mehaničku prepreku i kemijsku zaštitu, zatim nespecifične topljive tvari, kao što su komplement, interferon, lizozim, te stanični mehanizmi pretežito fagociti.

Specifična imunost se razvija u kontaktu s uzročnicima bolesti, ne postoji prije prvog kontakta i potrebni su dani, tjedni ili mjeseci da bi se razvila. Specifična imunost može biti stečena aktivno ili pasivno, te stečena prirodnim ili umjetnim putem.

Ove dvije vrste imunosti ne djeluju odvojeno jedna od druge, već se međusobno nadopunjavaju. Nespecifična imunost određuje vrstu specifičnog imunološkog odgovora, dok specifična imunost dalje usmjerava i pojačava nespecifičnu.

## 2. NESPECIFIČNA IMUNOST

Nespecifična (urođena, prirođena) imunost na brojne antigene postoji trajno u organizmu i prije dodira s njima. Ona nije specifično usmjerena protiv određenog antigena niti ostavlja sjećanje na njega. Ova vrsta imunosti čini zapravo prvu crtu obrane i od rođenja osigurava vrlo dobru zaštitu protiv većine mikroorganizama. Ukoliko antigen prodre kroz tu zaštitu, pojavljuje se specifična imunost. Specifična (stečena) imunost ne djeluje neovisno o nespecifičnoj imunosti, nego je ona nadograđena na nespecifičnu i usko s njom surađuje. Zajedničkim djelovanjem one se dopunjuju i pojačavaju, čime postižu mnogo učinkovitiju obranu organizma. Na učinkovitost nespecifične obrane utječu brojni čimbenici kao što su: spol, dob, genetika, prehrana, bolesti, te primjena imunosupresijskih i imunostimulacijskih tvari.

Nespecifična se imunost temelji na anatomskim, fiziološkim, fagocitnim zaprjekama i na upali. Pod anatomske zaprjeke ubrajamo najvažnije organe koji štite organizam od prodora brojnih uljeza ne samo fizičkom pregradom i mehaničkim uklanjanjem nego i kemijskim tvarima u izlučevinama i na površinama. Anatomske zaprjeke su koža i sluznice koje fizički, kemijski i mehanički sprječavaju ulazak antigena.

### *Anatomske prepreke*

**Koža.** Mali broj mikroorganizama može proći kroz kožu, jer se površinski sloj kože sastoji od gustog sloja stanica keratinocita. Te stanice proizvode protein keratin koji izgrađuje nokte i dlake na površini kože. Ove strukture mikroorganizmi ne mogu razgraditi enzimima. Stalna izmjena površinskog sloja kože, zajedno za mrtvim epitelnim stanicama, sprječava naseljavanje mikroorganizama na koži. Koža je stalno izložena vanjskim faktorima, što dovodi do njene suhoće, čime se stvaraju nepovoljni uvjeti za mikroorganizme. Koža ima optimalnu pH vrijednost od 5-6, što je prekisela sredina za stvaranje kolonija većine mikroorganizama. Sekret lojnih žlijezda kože zadržava patogene mikroorganizme na površini kože, dok su znojne žlijezde odgovorne za nižu pH vrijednost površine kože (Ottonello i sur., 2002a).

**Sluznice.** Sluznica očiju, dišnog sustava, probavnog sustava, kao i urogenitalnog sustava može se u velikoj mjeri obraniti od mikroorganizama. Epitelne stanice sluznice luče tvari koje su toksične za bakterije, kao npr. lizozim, defenzini. Jedna od antibakterijskih tvari - lizozim, poznatiji kao prirodni antibiotik tijela, (enzim također poznat pod nazivom muramidaza) može uništiti staničnu stijenku bakterije. Lizozim se izlučuje putem sline, suza i znojnih žlijezda, a djeluje razgrađujući peptidoglikan, gradivnu tvar stanične stijenke.

Stanice crijevne sluznice luče pored defenzina i kriptocidine, koji također imaju antibakterijsko djelovanje. Dodatnu zaštitu pružaju i stanice specifičnog imuniteta, B limfociti koji proizvode i oslobađaju sekretorne imunoglobuline A. Slina i želučna kiselina sprječavaju prodor bakterija preko probavnog trakta.

Sluznica dišnog sustava također sudjeluje u obrani od mikroorganizama. Protok zraka kroz kanale dišnog sustava vrlo je turbulentan, što dovodi do kontakta čestica i mikroorganizama s membranama sluznice dišnog sustava. Trepaljke pomažu da se ove čestice i mikroorganizmi skupe i izbace van iz organizma.

U mokraćnom sustavu se dio bakterija iz mokraćnih puteva uklanja mokrenjem.

Sluznice naseljavaju različite bakterije koje čine bakterijsku komenzualnu floru. One svojom prisutnošću sprječavaju naseljavanje patogenih bakterija, uklanjaju toksine patogenih bakterija i stalno stimuliraju obrambeni sustav (Ottonello i sur., 2002b).

### ***Fiziološke prepreke***

Fiziološke prepreke su značajke organizma koje otežavaju ili onemogućuju djelovanje antigena, poput povišene tjelesne temperature, sadržaj kisika ili pH tkiva. U izvanstaničnoj tjelesnoj tekućini, a posebno u plazmi, postoje različite tvari koje sudjeluju u nespecifičnoj obrani organizma. One najčešće potiču funkciju fagocita time što potiču kemotaksiju i opsonizaciju.

Komplementarni sustav se aktivira klasičnim putem vezanjem s protutijelima, no taj sustav mogu izravno pokrenuti i alternativnim putem neki polisaharidi s površine većine mikroorganizama. Primjerice, endotoksin u membrani brojnih gram-negativnih bakterija pokreće lizu gram-negativnih bakterija u dodiru sa serumom bez specifičnih protutijela.

Interferoni se definiraju kao skup peptida koji se stvaraju u stanici zaraženoj virusom, a koji imaju antivirusno djelovanje. Temelj djelovanja je kočenje sinteze RNK i DNK u stanicama domaćina. Uz antivirusno djelovanje, interferon djeluje i antiproliferacijski i imunoregulacijski. Izlučuju ga i limfociti, makrofagi i druge stanice i to ne samo pri kontaktu s virusima, nego i pri drugim podražajima. Prema funkcijskim značajkama razlikuju se tri vrste interferona: interferon  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) i interferon  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) koji djeluju primarno antivirusno i antiproliferacijski, te interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) koji djeluje imunoregulacijski.

Plazma sadrži protutijela (imunoglobuline) koje proizvode limfociti B. Uobičajena protutijela usmjerena su protiv eritrocita iste (krvne grupe) pa i druge vrste, ali i protiv različitih mikroorganizama. Nadalje, lizozim se osim na tjelesnim površinama, nalazi i u izvanstaničnoj tekućini. Proizvode ga i izlučuju fagociti, posebno monociti i makrofagi.

### ***Stanična komponenta nespecifične imunosti***

Bez obzira što mnoge anatomske i fiziološke barijere poput kože mogu spriječiti prodor stranih mikroorganizama, one nisu neprobojne, tako da mikroorganizmi često uspiju prodrijeti u tkiva. Nakon prepoznavanja određene vrste stanica, preko raznih faktora i signala, mikroorganizmi postaju dostupni leukocitima koji ih probavljaju i uništavaju procesom zvanim fagocitoza. Glavni cilj upalnog procesa je osigurati fagocitnim stanicama što prije i učinkovitije presretanje i uništavanje stranih mikroorganizama (Boehm i Bleul, 2007.).

Obrambene stanice organizma koje cirkuliraju u krvotoku pripadaju leukocitima, odnosno bijelim krvnim stanicama. Leukociti potječu iz multipotentnih matičnih stanica smještenih u koštanoj srži. Sve vrste leukocita potječu iz matičnih stanica mijeloične ili limfatične loze u koštanoj srži, te sve služe obrani organizma. Neutrofili i makrofagi su leukocitne stanice specijalizirane isključivo za uništavanje i razgradnju mikroorganizama (Areschoug i Gordon, 2009.). Iako potječu iz iste vrste matičnih stanica, izgledom su vrlo različiti te imaju različite, ali međusobno nadopunjujuće uloge u organizmu. Tako neutrofili velikom brzinom odgovaraju na prodor mikroorganizama i probavljaju ih, ali nisu sposobni održati kontinuiranu fagocitozu. Nasuprot tome, makrofagi odgovaraju puno sporije, ali su zato učinkovitiji fagociti i dulje zadržavaju sposobnost fagocitoze.

Fagociti su stanice koje među prvima dolaze u dodir s mikroorganizmima ili stranim tvarima koje prodiru u organizam. Osnovni mehanizmi djelovanja fagocita su



endocitoza i pinocitoza topljivih tvari te fagocitoza čestica i mikroorganizama s posljedičnom enzimskom razgradnjom fagocitiranih tvari i liziranjem mikroorganizama. Na taj način fagociti uklanjaju mnoge uljeze te pritom ne potiču specifičnu imunost. Ta aktivnost fagocita temeljni je mehanizam nespecifične imunosne obrane organizma. Sve fagocitne stanice nastaju u koštanoj srži od zajedničke prastanice mijeloidne loze. U fagocite se osim monocita i makrofaga ubrajaju i srodne stanice mononuklearnoga fagocitnog sustava, uključujući i Kupfferove stanice u jetri, mezangijalne stanice u bubregu, mikroglia u mozgu i granulociti (mikrofagi) u krvi i tkivima. Od granulocita najvažniji fagociti jesu neutrofilni granulociti, a u manjoj mjeri i eozinofili. Svi su fagociti, zajedno sa retikularnim vlaknima za koje prijanjaju u perifernim tkivima, prije bili poznati pod nazivom retikuloendotelni sustav (RES). Većina fagocita ima svojstvo ameboidnog kretanja što im omogućuje dospijevanje do stranih čestica i uljeza koji prodiru u organizam (Thomas i sur., 2002.). Gibanje fagocita znatno pospješuju i usmjeruju kemotaktičke tvari. One privlače fagocite (pozitivna kemotaksija), a znatno rjeđe ih odbijaju (negativna kemotaksija). Različiti fagociti reagiraju na različite kemotaktičke podražaje, ali gotovo uvijek reagiraju na C5a ulomak komplementa koji se oslobađa aktivacijom komplementa tijekom lokalne upale. Vrlo snažne kemotaktičke tvari jesu i mali peptidi iz skupine kemokina (kemotaktičkih kemokina). Fagociti sadrže adhezijske molekule za endotel krvnih žila i tvari u međustaničnom matriksu te stoga mogu prolaziti kroz stijenke krvnih žila (dijapedeza) u prostor oko krvnih žila (ekstravazacija).

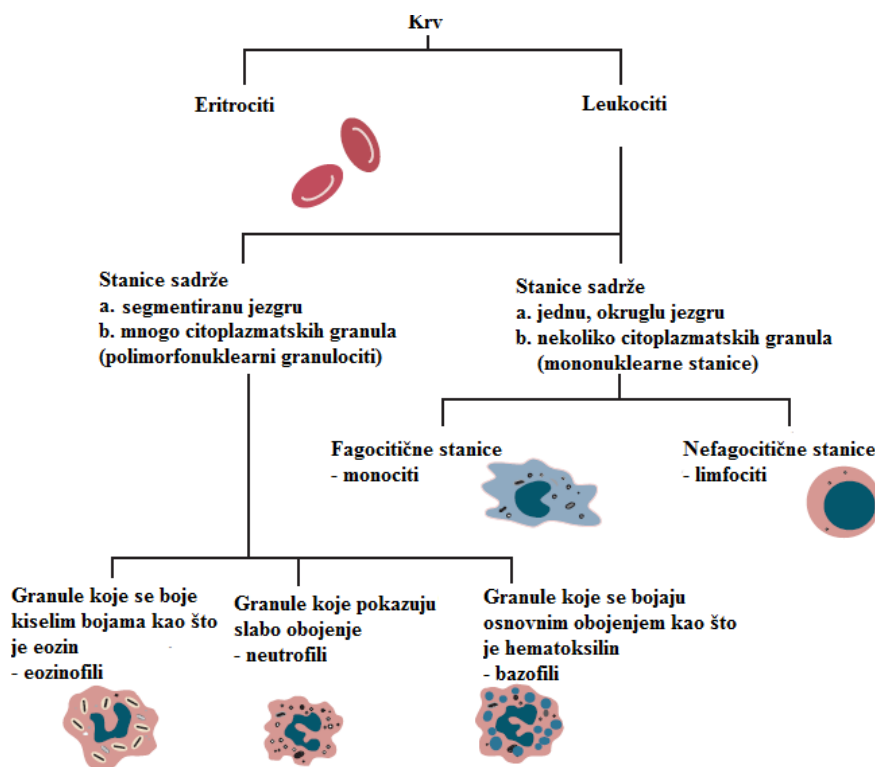
Monociti nastaju u koštanoj srži od zajedničke mijelopoetske prastanice koja se diferencira u prastanicu monocitne loze. Iz usmjerene prastanice monocitne loze nastaju promonociti koji sazrijevaju u monocite i prelaze u krv. Sazrijevanje monocita pomažu citokini, posebice čimbenik poticanja granulocitno-makrofagnih kolonija G-CSF (eng. Granulocyte-colony stimulating factor) i čimbenik poticanja monocitnih kolonija M-CSF (eng. Macrophage colony-stimulating factor). Monociti u krvi borave jedan do četiri dana i potom odlaze u tkiva, gdje postaju tkivni makrofagi. Zajedno sa srodnim stanicama retikuloendotela i glija stanicama oni čine mononuklearni fagocitni sustav. Makrofagi su stanice koje se nalaze u različitim tkivima i seroznim šupljinama i to kao slobodne i fiksne stanice. Slobodnih makrofaga ima mnogo u peritonealnoj i pleuralnoj šupljini, plućima, koštanoj srži i nešto manje u slezeni i limfnim čvorovima. Fiksni makrofagi nalaze se u različitim tkivima i poznati su pod raznim imenima: u vezivnom tkivu i oko mišića su histiociti, u jetri Kupfferove stanice, u mozgu mikroglia stanice, u bubregu mezangijalne

stanice, a u plućima alveolarni makrofagi. Makrofagi i neutrofilni nose površinske receptore kojima prepoznaju uobičajene tvari od kojih je građena stijenka brojnih bakterija i zatim ih fagocitiraju. Također izlučuju brojne tvari kojima potiču upalnu reakciju, ali i specifičnu imunosnu reakciju (Areschoug i Gordon, 2009.).

Upalni odgovor čini niz standardnih reakcija kojima organizam reagira na bilo koje oštećenje. Nakon takvog oštećenja, fizičkog, kemijskog ili biološkog pojavljuje se jedinstvena reakcija organizma – upala. Riječ je o slijedu vaskularnih, neuroloških, humoralnih i celularnih događaja koji najprije razaraju, razrjeđuju ili ograđuju štetnu tvar, a poslije zacijele prouzročenu ozljedu. Upala je uvod u svaku specifičnu imunosnu reakciju.

### 3. NEUTROFILI

Leukocite dijelimo na granulocite i agranulocite. Granulociti su leukocitne stanice koje u svojoj citoplazmi sadrže granule. Karakteristični su po svojim multilobularnim, nepravilnim jezgrama, pa se nazivaju još polimorfonuklearima. Granulociti se dalje dijele prema boji koja djeluje na njihove granule (Slika 1). Tako postoje bazofili, stanice čije granule pokazuju hematoksilinsko bojenje, zatim eozinofili čije granule karakterizira eozinsko bojenje, i neutrofil, stanice čije se granule izrazito malo boje bojama poput hematoksilina ili eozina (Areschoug i Gordon, 2009.). Svi granulociti imaju važnu ulogu u obrani organizma.



Slika 1. Vrste i nomenklatura krvnih stanica.

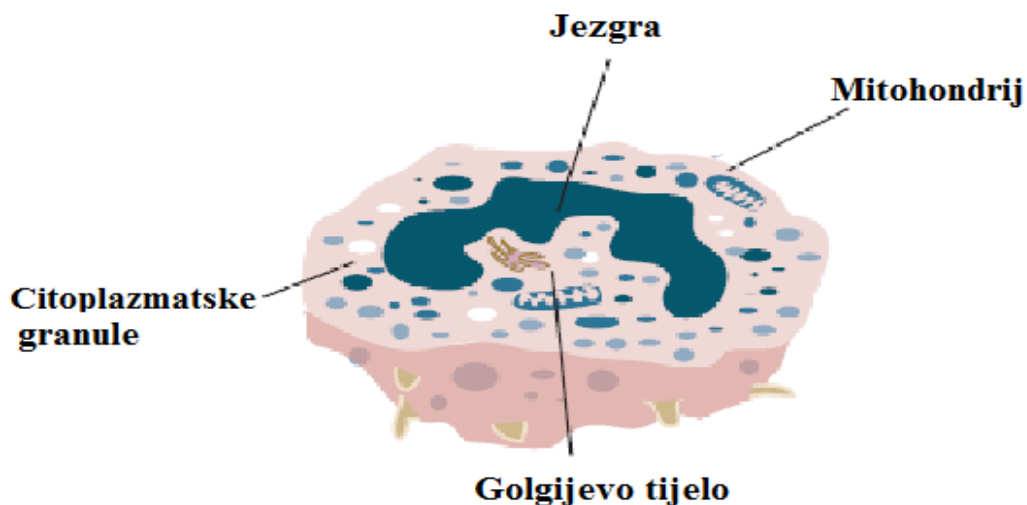
Izvor: preuzeto od Tizard, 2012.

Neutrofili nastaju u koštanoj srži iz matičnih stanica pod utjecajem regulatornih citokina poput G-CSF, interleukin 3 (IL-3), faktora matičnih stanica, interleukin 1 (IL-1) i interleukin 8 (IL-8) (Shi i sur., 2001.). Proizvodnja neutrofila regulirana je citokinima, a gubitak neutrofila kontroliran je brzinom njihove apoptoze. Neutrofili migriraju u tkiva, gdje na kraju prelaze u fazu apoptoze te ih fagocitiraju makrofagi. Ti makrofagi proizvode interleukin-23 (IL-23). Interleukin 23 (IL-23) potiče limfocite na proizvodnju interleukina-17 (IL-17) koji potiče proizvodnju G-CSF faktora i aktivnost matičnih stanica. Kao rezultat toga javlja se ujednačenje brzine stvaranja novih neutrofila s brzinom apoptoze. Na mijeločnim matičnim stanicama su izraženi i receptori slični proteinu Toll (eng. Toll-like receptor - TLR). Tijekom infekcije mikroorganizmima, molekule karakteristične za patogene mikroorganizme (eng. Pathogen-associated molecular patterns, PAMP) kao što su lipopolisaharidi, vežu se za TLR receptore i potiču matične stanice na dodatnu proizvodnju neutrofila. Tako TLR receptori osiguravaju mehanizam kojim se dostupnost neutrofila brzo povećava kao odgovor na infekciju (Borregaard, 2010.).

Neutrofili nastaju iz matičnih stanica koštane srži, zatim migriraju u krvotok te 12 sati poslije odlaze u tkiva (Hart i sur., 2000.). Životni vijek im je samo nekoliko dana, stoga moraju konstantno biti zamijenjeni novim stanicama. Udio neutrofila u krvi kreće se oko 60 do 75% kod većine mesojeda, oko 50% kod konja te 20 do 30% kod goveda i laboratorijskih glodavaca. Važno je napomenuti da samo 1 do 2% ukupnog broja neutrofila pripada cirkulirajućim neutrofilima. Većina neutrofila se nalazi u tkivu jetre, slezene, pluća i koštane srži. Tijekom bakterijskih infekcija, brojnost cirkulirajućih neutrofila može se povećati i do 10 puta jer se pohranjene stanice otpuštaju iz koštane srži i ostalih organa (Beutler i Rietschel, 2003.).

### 3.1. Građa neutrofila

Neutrofilni periferne krvi su okrugle stanice promjera 10 – 20  $\mu\text{m}$ . Citosol im sadrži ravnomjerno raspoređene granule, a u sredini se nalazi jezgra nepravilnog oblika (Slika 2). Kromatin u jezgri je prilično zgusnut i zbijen. Elektronska mikroskopija pokazuje tri glavne vrste granula bogatih enzimima u citosolu. Primarne, odnosno azurofilne granule sadrže enzime kao što su mijeloperoksidaza, lizozim,  $\beta$ -glukuronidaza i katepsin B. Sekundarne, odnosno specifične granule ne sadrže mijeloperoksidazu, ali zato posjeduju lizozim i kolagenazu, te laktoferin, protein koji služi transportu željeza. Tercijarne granule sadrže enzim želatinazu. Navedene granule sintetiziraju se u različitim stadijima staničnog razvoja. Tako se primarne granule sintetiziraju u fazi promijelocita, sekundarne granule u mijeloidnoj fazi, a tercijarne granule nastaju u kasnijim stadijima razvoja. Granule nastale u ranijem razvoju rijetko se egzocitiraju, dok se tercijarne granule odmah egzocitiraju.



Slika 2. Građa neutrofila

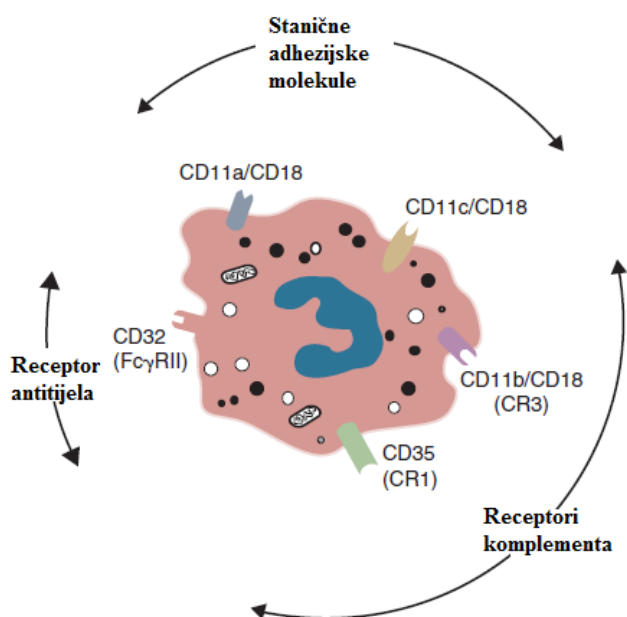
Izvor: preuzeto od Tizard, 2012.

Obzirom da neutrofilne granule sadrže kompleksnu smjesu baktericidnih molekula, stanice mogu regulirati njihovo otpuštanje na upalna mjesta. Proteini iz neutrofilnih

granula povećavaju prijanjanje monocita na vaskularni endotel, potiču makrofage na lučenje citokina, i aktiviraju dendritičke stanice, odnosno potiču prikazivanje antigena. Sekretorne vezikule neutrofila i membrane granula također služe kao skladišna mjesta za receptore i druge membranske proteine. Zreli neutrofilni imaju malo Golgijevo tijelo, mitohondrije, nekoliko ribosoma i mali hrapavi endoplazmatski retikulum (Borregaard, 2010.).

### 3.2. Površinski receptori neutrofila

Stanice reagiraju s mnogim molekulama u svojoj blizini, zbog čega posjeduju brojne receptore na svojoj površini. Površinski glikoproteini svrstavaju se prema diferencijacijskim biljezima (eng. cluster of differentiation, CD). Neutrofilni nose brojne različite CD molekule na svojoj površini (slika 3). Najvažniji od tih proteina su receptori za opsonine, kao i receptori koji vežu neutrofile na stijenke krvnih žila. U ostale molekule na površini neutrofila pripadaju receptori za upalne medijatore kao što su leukotrijeni, za komponente sustava komplementa kao što je C5a, za kemokine i citokine (Collota i sur., 1994.).



Slika 3. Glavni površinski receptori na neutrofilima i njihova funkcija

Izvor: preuzeto od Tizard, 2012.

## **Integrini**

Integrini su najvažniji među brojnim bjelančevinama koji se nalaze na površini stanica, a djeluju na njihovo međusobno spajanje. Podjeljeni su u nekoliko skupina. Svaki se sastoji od heterodimera kojeg čini par proteinskih lanaca. Heterodimer je građen od jedinstvene  $\alpha$ -podjedinice koja je spojena s općom  $\beta$ -podjedinicom zajedničkom za pojedinu skupinu integrina. Na primjer, neutrofilima posjeduju tri  $\beta$ 2-integrina. Njihova  $\alpha$ -podjedinica (CD11a, b ili c) je povezana sa općom  $\beta$ 2-podjedinicom (CD18). Dakle ova tri integrina se označavaju kao: CD11a/CD18, CD11b/CD18 i CD11c/CD18. Kao što je ranije opisano, LFA-1 (eng. Lymphocyte function-associated antigen 1) (CD11b/CD18) na aktiviranim neutrofilima veže se sa bjelančevinom ICAM-1 (eng. Intercellular Adhesion Molecule 1) na stanicama kapilarnog endotela. CD11b/CD18 integrin također veže leukocite na endotelne stanice i receptor je za određene komponente sustava komplementa, kao što je receptor komplementa-3 (eng. Complement receptor-3 - CR3).

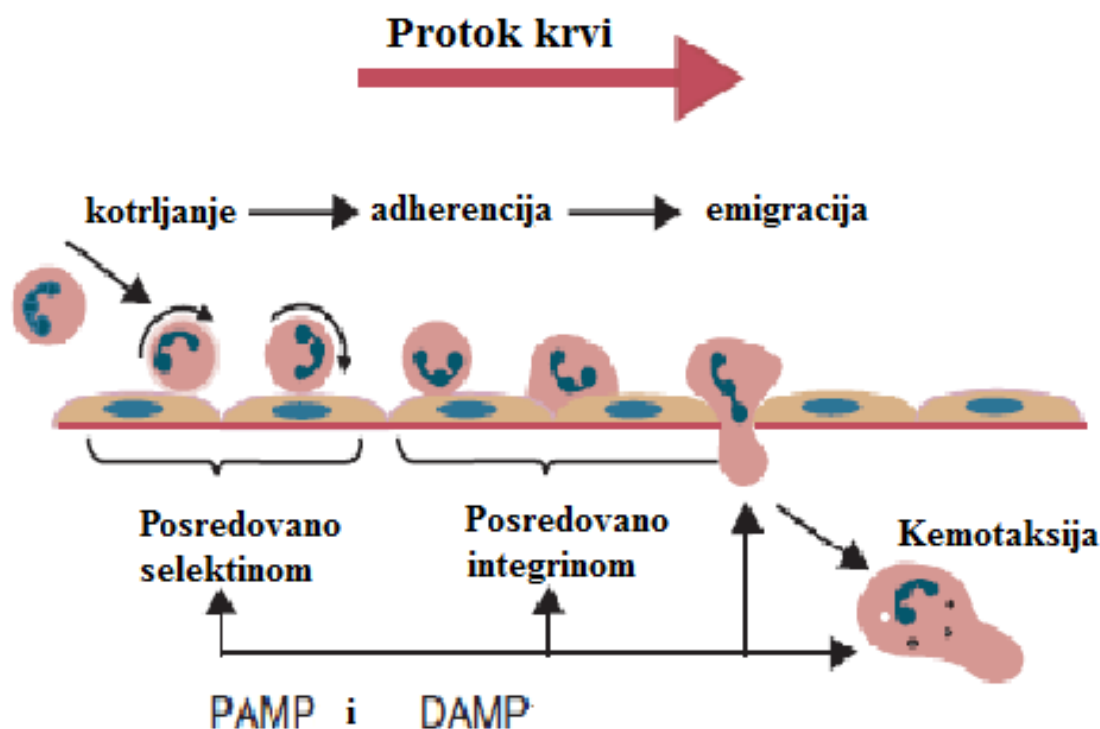
## 4. MIGRACIJA NEUTROFILA IZ KRVOTOKA

Cirkulirajući neutrofilni nalaze se unutar krvotoka pa su u zdravim tkivima neutrofilni jednostavno nošeni strujom krvi. U tkivima pod upalom, mrtve i umiruće stanice otpuštaju kemokine koji dovode do usporavanja i zaustavljanja cirkulirajućih neutrofila, njihovog vezanja na stijenke krvnih žila te prelazak u tkiva procesom dijapedeze. Taj prelazak neutrofila potaknut je tvarima koje djeluju na endotelne stanice krvnih žila, ali i na same neutrofile.

### *4.1. Promjene na endotelnim stanicama*

Endotelne stanice koje oblažu stijenke krvnih žila imaju izrazito veliku površinu, ovisno o životinjskoj vrsti i do nekoliko tisuća kvadratnih metara, tako da služe kao veliki senzor pri prodoru mikroorganizama. Kada bakterijski proizvodi, kao što su lipopolisaharidi (LPS) ili spojevi koji se otpuštaju pri oštećenjenju tkiva (eng. damage-associated molecular patterns, DAMP), poput trombina ili histamina, dođu do kapilarnog endotela, stimuliraju stanice da luče glikoprotein P-selektin (CD62P) na svojoj površini. P-selektin je inače pohranjen u granulama citoplazme, ali može dospjeti na površinu stanice, za što je potrebno svega nekoliko minuta od stimulacije stanice. Nakon što se P-selektin nađe na površini stanice, može vezati protein L-selektin (CD32L) koji se nalazi na površini cirkulirajućih neutrofila. U početku je ta interakcija slaba, s obzirom da neutrofilni mogu odbaciti svoj L-selektin te dolazi do naizmjeničnog uspostavljanja i prekidanja veza među ligandima, što omogućava kotrljanje neutrofila duž endotelnih stanica. Ipak, kotrljajući se uz površinu endotelnih stanica neutrofilni polako usporavaju, te se na kraju potpuno zaustave (Slika 4.) Ovo se uglavnom odvija u venulama koje imaju tanje stijenke i promjer dovoljno mali da omogući neutrofilima čvrsto prianjanje na endotel.





Slika 4. Faze adhezije i emigracije neutrofila iz krvotoka. Promjene u endotelnim stanicama potaknute su oštećenjima tkiva i napadima mikroorganizama. Veća ekspresija P-selektina na površini endotelnih stanica vuče neutrofile i potiče ih na kotrljanje te ih pri tome uporava. Kada se oni u potpunosti zaustave, integrini ih snažno vežu za vaskularne endotelne stanice potičući ih na izlazak iz krvne žile u tkivo.

Izvor: preuzeto od Tizard, 2012.

#### 4.2. Promjene na neutrofilima

Kako se neutrofilu kotrljaju površinom endotela, tako započinje druga faza prijanjanja. Čimbenik koji aktivira trombocite (eng platelet-activating factor, PAF) kojeg izlučuju endotelne stanice, potiče kotrljajuće neutrofile na ekspresiju adhezijskog proteina CDa/CD18 ili (LFA-1). LFA-1 je integrin koji se veže na unutarstaničnu adhezijsku molekulu-1 (ICAM-1 ili CD54) endotelnih stanica. Ovo čvrsto vezanje rezultira potpunim zaustavljanjem neutrofila i njihovim pričvršćivanjem na stijenku krvnih žila unatoč protoku krvi. Pričvršćeni neutrofilu izlučuju male koncentracije elastaze. Elastaza uklanja

CD43 ili leukosialin, protuadhezijski protein sa površine neutrofila, omogućujući neutrofilima da se još čvršće vežu za endotelne stanice.

Nekoliko sati poslije, citokini poput IL-1, IL-23 ili faktor nekroze tumora- $\alpha$  TNF- $\alpha$  (eng. tumor necrosis factor alpha), potiču ekspresiju jake adhezijske molekule E-selektin (CD62E) na endotelnim stanicama. IL-1 i IL-23 također induciraju endotelne stanice na proizvodnju kemokina CXCL8, a to privlači još više neutrofila. TNF- $\alpha$  stimulira endotelne stanice na lučenje IL-1. Također potiče vazodilataciju, djelovanje faktora zgrušavanja, trombozu, te povećava ekspresiju adhezijskih proteina i kemotaktičnih molekula (Hickey i Kubes, 2009.).

Sami neutrofilni povećavaju propusnost krvnih žila i stvaraju procijepa između endotelnih stanica kao rezultat kontrakcije endotelnih stanica i pucanja međustaničnih veza. Izlučuju kemokine CXCL1, 2, 3 i 8 kao odgovor na vezanje svog LFA-1 na ICAM-1 endotelnih stanica. Neutrofilna fosfolipaza A2 otpušta arahidonsku kiselinu, koja se pretvara u leukotrijen A<sub>4</sub>. Njega zatim obrađuju endotelne stanice u daljnje metabolite arahidonske kiseline, tromboksan A<sub>2</sub> i leukotrijen C<sub>4</sub>, medijatore koji djeluju na krvožilnu propusnost. Neutrofilni oksidansi također povećavaju propusnost krvnih žila.

### **4.3. Migracija**

Nakon što su potpuno zaustavljeni i vezani za stijenke krvnih žila, neutrofilni počinju emigrirati u okolna tkiva pod utjecajem kemoatraktanata. Većina migrirajućih neutrofila se provuče između endotelnih stanica. No, oko 20% neutrofila zapravo prođe kroz endotelne stanice, pri čemu proizvode proteaze kako bi prošli kroz bazalnu membranu. Zatim se gibaju prema bilo kojem stranom mikroorganizmu, pri čemu se aktiviraju. Obzirom da su neutrofilni najpokretniji leukociti u krvi, logično je da su prve stanice koje dopijevaju do mjesta oštećenja na tkivima (Hickey i Kubes, 2009.).

Migracija neutrofila prilikom akutne upale

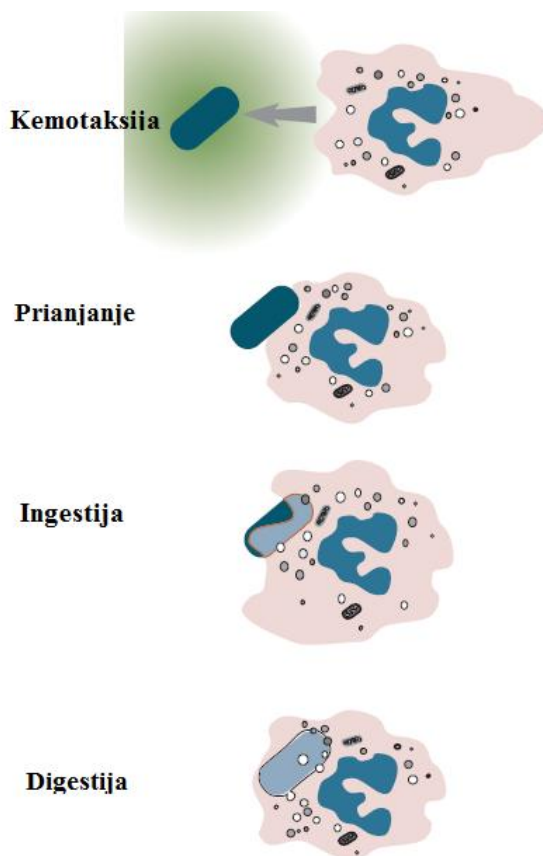
Akutna upalna reakcija predstavlja prvu liniju obrane protiv štetnih podražaja i predstavlja početnu fazu u procesu ozdravljenja ozljeda tkiva. Promjene na mikrocirkulacijskoj razini, odnosno povećanje lokalnog protoka krvi, poboljšana

propusnost kapilara i migriranje cirkulirajućih leukocita karakteristike su imunskog odgovora te dovode do pojave kliničkih simptoma upale: crvenila, vrućice, otekline i boli. Fiziološka izmjena tekućina i otopljenih tvari koje su transportirane između krvi i tkiva strogo je kontrolirana kapacitetom selektivnih barijera endotela (Vestweber, 2000.). U normalnim uvjetima, propusnost za makromolekule je ograničena, dok voda i male otopljene tvari slobodno prolaze kroz kapilare pod homeostatskom kontrolom hidrostatskog i osmotskog tlaka izvan i unutar vaskularnih odjeljaka. Kod upale, endotelne barijere su ugrožene i postaju popustljivije za velike molekule, što dovodi do istjecanja bjelančevina plazme iz krvnih žila i kasnijeg formiranja edema. Od prije je poznato da broj upalnih posrednika npr. histamina, bradikina i cisteinil leukotriena izravnom interakcijom sa svojim receptorima na endotelnim stanicama imaju sposobnost izazvati promjenu propusnosti u postkapilarnim venulama. Istraživanja *in vivo* pokazuju da je ekstravazacija neutrofilnih granulocita povezana sa povećanjem vaskularne propusnosti (Sanchez-Madrid i del Pozo, 1999.). Tim je istraživanjem utvrđeno da sposobnost različitih kemoatraktanata za induciranje hiperpermeabilnosti ovisi o prisutnosti neutrofila, ili točnije intaktnoj adhezivnoj funkciji ovih stanica. Mehanizam odgovoran za induciranje promjene vaskularne propusnosti ostaje još uvijek nepoznat. Otvaranje endotelne barijere radi omogućavanja izlaska leukocita i komponenti plazme predstavlja fiziološku reakciju od iznimne važnosti u obrani domaćina (Dallegrì i Ottonello, 1997.).

## 5. FAGOCITOZA

Makrofagi, neutrofil i dendritičke stanice u tkivima te monociti u krvi glavne su vrste stanica koje vrše fagocitozu tj. stanično proždiranje bakterija.

Dolaskom na mjesto prodora mikroorganizama, neutrofil počinju probavljati i uništavati bakterije putem fagocitoze. Iako je riječ o jednom kontinuiranom procesu, fagocitoza se može podijeliti u posebne faze: aktivacija, kemotaksija, prianjanje, ingestija i digestija (Slika 5).



Slika 5. Faze procesa fagocitoze

*Izvor:* preuzeto od Tizard, 2012.

## **5.1. Aktivacija**

Neutrofili napadaju i uništavaju mikroorganizme tek nakon svoje aktivacije. Tako kad se neutrofili vežu na endotelne stanice i prime dvostruki signal od integrina za vezanje i stimulacije posredovane TNF- $\alpha$ , CXCL8 ili C5a, počinju izlučivati elastazu, defenzine i oksidanse. Elastaza potiče njihovu sposobnost adhezije ili prijanjanja. Oksidansi aktiviraju tkivne proteaze, koje odcjepljuju više TNF- $\alpha$  iz makrofaga, a TNF- $\alpha$  privlači više neutrofila (Chroneos, 2010.).

## **5.2. Kemotaksija**

Neutrofili imaju usmjereno kretanje prema mikroorganizmima i oštećenim tkivima privučeni kemotaktičnim molekulama. Ovi kemoatraktanti difundiraju s mjesta prodora mikroorganizama i stvaraju koncentracijski gradijent. Neutrofili se gibaju prema području najviše koncentracije, odnosno prema izvoru kemoatraktanata. Neutrofili stvaraju izdanke (lamelipodije) kako bi se pokretali. Receptori kemoatraktanata rašireni su po površini neutrofila, ali smještaj lamelipodija određen je najvišom koncentracijom atraktanata.

Prodor mikroorganizama i oštećeno tkivo proizvode brojne različite kemoatraktante, uključujući peptid C5a nastao aktivacijom sustava komplementa, zatim fibrinopeptid B nastao iz fibrinogena, i vodikov peroksid. Vodikov peroksid može stvoriti kemotaksijski gradijent samo 5 minuta od oštećenja tkiva, čime počinje kretanje prvih neutrofila prema ozljedi. U ostale kemoatraktante pripadaju kemokini i lipidi poput leukotrijena B<sub>4</sub>. Bakterije otpuštaju peptide s formil metioninskim skupinama koje posebno privlače neutrofile nekih vrsta sisavaca. Na taj način neutrofili primaju brojne signale koji ih privlače i usmjeravaju prema mjestu prodora mikroorganizama i oštećenja tkiva. No, nemaju sve životinje jednako prijemljive neutrofile. Na primjer, neka goveda sa specifičnim genotipom receptora CXCR2 pokazuju reducirano kretanje neutrofila u usporedbi sa normalnim govedom. Krave sa ovim genotipom također pokazuju smanjenu ekspresiju integrinskih podjedinica CD18 i CD11b, a kao rezultat toga javlja se smanjena otpornost na mastitis (Hickey i Kubes, 2009.).

Nekoliko članova kemokina skupine CXC opisani su kao sposobni neutrofilni kemoatraktanti. CXCL8 jedan je od najbolje opisanih kemokina za neutrofile, može ga proizvesti gotovo svaka stanica s jezgrom pod odgovarajućim stimulativnim uvjetima (Fujie i sur., 1999.). Smatra se da je CXCL8 ključni faktor jačanja i aktivacije kod akutne upale. Proizvodnja CXCL8 pozitivno je i negativno regulirana citokinima, adhezijom, djelovanjem bakterija i oksidativnim stresom. Nestimulirani neutrofilni perifernog krvotoka poznati su po ekspresiji relativno visoke razine CXCL8 receptora poput CXCR1 i CXCR2. Na stimulaciju odgovarajućim ligandima ove stanice odgovaraju snažnom kemotaksijom, kao i povećanom adhezijom, stvaranjem superoksida, oslobađanjem proteolitičkih enzima, te poboljšanom baktericidnom sposobnošću. CXCL8 veže se na receptore CXCR1 i CXCR2 (Del Rio i sur., 2001.). Ostali kemoatraktanti neutrofila poput CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5 i CXCL7 vežu se i djeluju preko receptora CXCR2.

Neutrofilni sadrže nekoliko drugih receptora za kemokine uključujući HCCR-1, CXCR3, CXCR4, CXCR5 i CX3CR1. Funkcija ovih receptora na neutrofilima još uvijek nije dovoljno istražena. Nedavna istraživanja ističu važnost ELR CXC kemokina CXCL10 i CC kemokina CCL7 u neutrofilima pluća.

Ekspresija neutrofila CXCR1 i CXCR2 je regulirana okolišnim čimbenicima. CXCR1 i CXCR2 mogu biti negativno regulirani bakterijskim proizvodima, protuupalnim citokinima i aktivacijom CD45, dok G-CSF može pozitivno regulirati ova dva receptora. Regulacija ekspresije receptora za kemokine može biti mehanizam za regulaciju akutnih upalnih procesa. Povećanje količine TNF $\alpha$  i LPS tijekom upalnih procesa, rezultira smanjenom ekspresijom CXCR1 i CXCR2 (Lee i Downey, 2001.). Ova negativna regulacija javlja se putem metaloproteinaza te čini neutrofile manje osjetljivima na CXCL8 u smislu proizvodnje oksidansa i kemotaksije. Lokalno smanjenje broja receptora za kemokine na aktiviranim neutrofilima predstavlja važan mehanizam regulacije akutnog upalnog odgovora. Kada se intravaskularni neutrofilni prerano aktiviraju, što se javlja tijekom bakterijske sepse, smanjenje broja CXC receptora za kemokine može ovim stanicama onemogućiti izlazak iz vaskularnog prostora i dovesti do defekta urođenog imunog odgovora ovisnog o neutrofilima. Smanjena migracija neutrofila u perifernim tkivima kao što su pluća, najčešće se događa prilikom sepse i dovodi do plućne infekcije (Terui i sur., 2000.). Smatra se da mehanizmi iza ove smanjene sposobnosti migracije uključuju smanjenje broja CXC receptora na intravaskularnim neutrofilima jednako kao i poništavanje kemokinog gradijenta između tkiva i vaskularnog prostora. Receptori za

kemokine koji se na površini neutrofila javljaju nakon aktivacije (CC receptori) nedavno su otkriveni, te ostaje razjasniti povezanost između konstitutivno izraženih CXC receptora i aktivacijom izazvanih CC receptora na tim stanicama. Funkcionalna povezanost i relativna prednost između ovih receptora nije poznata. Na neutrofilima može doći do smanjenja broja CXC receptora i povećanja broja CC receptora što može utjecati na upalni proces. Kada se CXC posredovan odgovorom neutrofila smanji, kao što je to tijekom sepse postoji mogućnost da CC kemokini budu funkcionalna zamjena (Chroneos, 2010.).

Tablica 1. Receptori za kemokine koji sudjeluju u aktivaciji neutrofila

Vrsta receptora	Receptor kemokine za	Kemokin	Sudjeluje li u aktivaciji neutrofila?
CXC	CXCR1	CXCL8 (IL-8)	Da
	CXCR2	CXCL6 (GCP-2)	Da
		CXCL1,2,3 (GRO $\alpha\beta\gamma$ )	
	CXCR3	CXCL5 (ENA-78)	Ne
		CXCL6 (GCP-2) CXCL7 (NAP2)	
CXCR4 CXCR5	CXCL10 (IP-10) CXCL9 (Mig) CXCL11 (I-TAC)	Ne Ne	
CC	CCR1	CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ) CXCL13 (BLC)	
		CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) CCL9 (MIP-1 $\gamma$ ) CCL7 (MCP-3) CCL5 (RANTES) CCL23 (MPIF-1)	Da
		CCL2, 8, 7, 13, 12 (MCP – 1, -2, -3, -4, -5)	Da
	CCR2	CCL11, 24, 26 (eotaxin- 1, -2, -3)	Ne
	CCR3	CCL7 (MCP-3) CCL13 (MCP-4)	Da
CCR6 CCR4, 5, 7, 8, 9, 10	CCL5 (RANTES) CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ) Višestruki kemokini	Da Ne	
C	XCR1	XCL1 (limfotaktin- $\alpha$ ) XCL2 (limfotaktin- $\beta$ )	Ne
CX3C	CXC3CR1	CX3CL1 (fraktalkin)	Ne

Izvor: preuzeto od Zlotnik i Yoshie, (2000.).

Mnoštvo različitih kemokina koji djeluju na neutrofile proizvodi se za vrijeme akutnog upalnog procesa. Primjerice, selektivna neutralizacija pojedinih kemokina iz skupine CXC, kao što je MIP2 ili KC uzrokuje male ili umjerene promjene u odgovoru domaćina na infekciju uzrokovanu s *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia asteroides*, dok blokada receptora CXCR2 u tim modelima uzrokuje značajne poremećaje u aktivaciji neutrofila (Moore, 2000.).

Učinci KC i MIP2 kemokina na neutrofile razlikuju se ovisno o mjestu djelovanja u organizmu. Tioglikolatom ili glikogenom izazvana upala peritoneuma dovodi do velikog povećanja MIP2, te velikog sistemskih povećanja KC (Call, 2000.). Zbog toga je MIP2 značajan za migraciju neutrofila u peritoneum, dok sistemsko povećanje KC djeluje na neutrofile u svim tkivima. To govori da domaćin može kontrolirati razinu upale reguliranjem omjera sistemske i lokalne ekspresije kemokina, što rezultira dobro kontroliranim sustavom.

### ***Utjecaj kemokina koje proizvode neutrofili na upalu***

Uz ulogu fagocitirajućih stanica koje sudjeluju u ranom imunom odgovoru, neutrofili su također izvor različitih citokina i drugih medijatora upale. Budući da su neutrofili prva vrsta leukocita koja u velikom broju infiltrira upalno područje, imaju i potencijal da djeluju na tijek upalnog procesa izlučivanjem različitih tvari, uključujući i kemokine. Neutrofili su važna integracijska točka za različite okolišne signale, koji mogu pozitivno ili negativno regulirati proizvodnju kemokina. Ove stanice su veliki proizvođači CXCL8 kemokina, a to je činjenica koja rezultira brzim proširenjem akutnog upalnog odgovora pomoću dva različita mehanizma: mobilizacijom još većeg broja neutrofila i spriječavanjem apoptoze kod mobiliziranih neutrofila (Dunican i sur., 2000.). Mnogi okolišni čimbenici potiču neutrofile na proizvodnju CXCL kemokina, a GM-CSF – antiapoptotički posrednik izaziva otpuštanje CXCL8 kemokina. Protuupalni citokini kao što su IL-1 i TNF- $\alpha$  kao i bakterijski LPS potiču proizvodnju CXCL8 kemokina. Tijekom uobičajenog upalnog odgovora, rana infiltracija neutrofila je često zamijenjena mononuklearnim infiltratom. Ta promjena vrste leukocita na mjestu upale upućuje na prolazak lezije ili progresiju u kroničnu upalu.



Neutrofili stimulirani CXCL8 kemokinom, otpuštaju sIL-6R (eng. soluble interleukin-6 receptor). Istraživanja su pokazala da je sIL-6 važan modulator mobilizacije leukocita s obzirom da se kod miševa kojima je onemogućeno stvaranje IL-6 povećava proizvodnja MIP2 i mobilizacija neutrofila prilikom upalnih procesa (Xing i sur., 1998.). Povećana migracija neutrofila kod ovih miševa može biti posredovana direktnim učincima na proizvodnju kemokina. Kada se doda sIL-6R zajedno sa IL-6 u peritonealnim mezotelnim stanicama, ovi čimbenici suprimiraju citokinima izazvanu proizvodnju CXC kimokina (CXCL8 i CXCL1) iz peritonealnih mezotelnih stanica, dok se istovremeno povećava proizvodnja CC kemokina (CCL2). Lokalno djelovanje CXC kemokina na određene neutrofile dovodi do supresije daljnje proizvodnje CXC kemokina te konačnog otpuštanja CC kemokina. Osim toga kemokini specifični za druge mononuklearne stanice, kao što su CCL3, CCL4-1 i CCL2 otpuštaju se iz neutrofila stimuliranih LPS, protuupalnim citokinima i meningokokalnim vezikulama. Smatra se da izlučivanje ovih kemokina pomoću neutrofila na mjestu upale dovodi do priljeva mononuklearnih stanica.

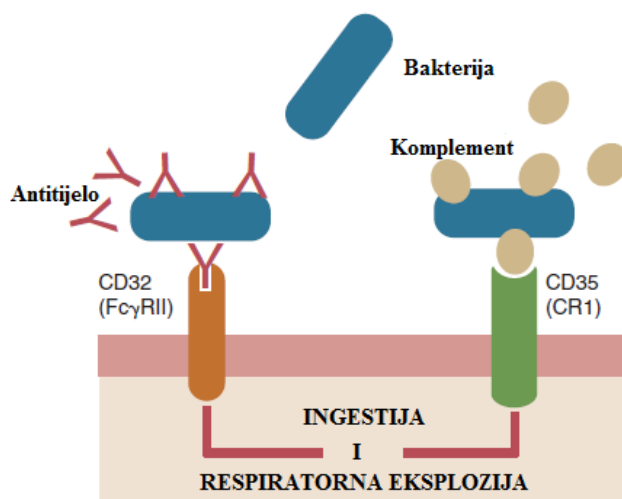
Proizvodnja kemokina od strane neutrofila predstavlja vezu urođene i stečene imunosti. Neutrofilima izazvana degranulacija CXCL8 pokazala se uzrokom otpuštanja defenzina, antibakterijskih peptida koji narušavaju integritet citoplazmatske membrane mikroorganizama. Defenzini također djeluju kao kemoatraktanti za nezrele dendritičke stanice i T-limfocite *in vitro*, te se pokazalo da regrutiraju T-stanice vezanjem na kemokini receptor CCR6 (Yang i Chertov, 1999.). Rana mobilizacija neutrofila pokazuje preduvjet za kasniji dotok T-stanica, sugerirajući da su kemoatraktanti nastali iz neutrofila doista važni za djelovanje T-stanica. CXCL8 koji potječu od neutrofila mogu djelovati na autokrini/parakrini način te stimulirati otpuštanje defenzina iz neutrofila, koji potiču stečeni imuni odgovor putem mobilizacije dendritičkih stanica i T-limfocita.

Mehanizam djelovanja citokina koji moduliraju akutni upalni odgovor najvjerojatnije uključuje kemokine koji potječu od neutrofila. IL-13, IL-10 i IL-4 su citokini poznati po tome što imaju snažna imunomodulatorna svojstva i druge biološke učinke smanjenjem proizvodnje nekih kemokina neutrofila. Protuupalne tvari kao što su kortikosteroidi, potiskuju proizvodnju CXCL8 u neutrofilima, potvrđujući činjenicu da kemokini koji potječu od neutrofila imaju važnu ulogu u razvoju upale (Chroneos, 2010.).

### 5.3. Prianjanje i opsonizacija

Kada neutrofil dođe u kontakt s nekom bakterijom, mora je „uhvatiti“. Ovaj proces se ne odvija spontano jer se zbog negativnih naboja stanice i bakterije međusobno odbijaju u tjelesnim tekućinama. Elektrostatski potencijal bakterije mora se neutralizirati na način da ih oblože pozitivno nabijene molekule. Molekule koje tako obavijaju bakterije s ciljem pokretanja fagocitoze nazivaju se opsonini, a sam proces opsonizacija.

Kao najvažniji primjer opsonina u organizmu mogu se izdvojiti protutijela, a mogu biti i neke komponente sustava komplementa, kao i manozna-vezajući lektin. Protutijela su najvažniji proteini stečenog imunog sustava te najučinkovitiji opsonini. Oni oblažu bakterije, vežu ih za receptore na fagocitnim stanicama i potiču njihovu ingestiju. Ovakav način fagocitoze u kojoj posreduju receptori za protutijela potiče vezanje bakterije opsonizirane protutijelima za receptor na neutrofilu, a u ovom slučaju riječ je o CD32 receptoru (Slika 6). Ligand za CD32 nalazi se na Fc podjedinici molekule protutijela, tako da je CD32 primjer Fc receptora (FcR). Kako postoji više različitih Fc receptora, CD32 receptor se označava kao Fc $\gamma$ RII.



Slika 6. Opsonizacija bakterije antitijelima i komplementom. Vežanje ovih liganda na svoje receptore aktivira ingestiju i respiratornu eksploziju. Receptor antitijela nazvan je CD32.

Izvor: preuzeto od Tizard, 2012.

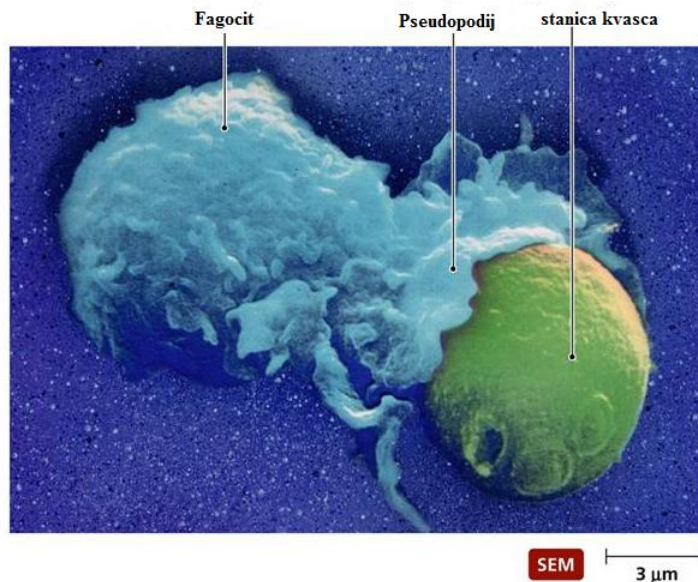
Međutim, proizvodnja protutijela odvija se tek nekoliko dana od nastupa infekcije, pa se organizam mora osloniti na opsonine prirodnog imunog sustava, kako bi se što prije zaštitio. CD35 ili receptor komplementa-1 CR1 (eng. complement receptor type 1), veže se za komponentu sustava komplementa C3b, koja je u ovom slučaju opsonin prirodnog imunog sustava. CR1 receptor se osim na neutrofilima nalazi i na ostalim granulocitima, monocitima, eritrocitima i B-stanicama. Vezanje opsonizacijskih čestica C3b na receptor CD35 na neutrofilu rezultira prijanjanjem neutrofila na mikroorganizam, ali ne mora nužno potaknuti ingestiju.

Na površini fagocita nalaze se i brojni receptori koji prepoznaju uzorke (eng. Pattern recognition receptor, PRR). Oni mogu prepoznati svoje ligande smještene na površini patogenih mikroorganizama. Tako neutrofili posjeduju manosa receptore ili integrine koji se mogu vezati direktno na bakteriju (Hickey i Kubes, 2009.).

Postoji i drugi važan mehanizam koji djeluje na povezivanje neutrofila i bakterije. Kada se bakterija susretne sa neutrofilom u krvnoj plazmi, može otplutati dalje krvlju. No, ako je bakterija uložena u tkivo ili zarobljena između površine neutrofila i neke druge stanice, i na taj način spriječena da otpluta dalje, postoji mogućnost da bude smjesta ingestirana. Iako se smatralo da neutrofili moraju fagocitirati bakteriju prije nego što je ubiju, također mogu zarobiti i uništiti bakterije izvanstanično. Takvi neutrofili mogu pretrpjeti oblik stanične smrti, takozvanu netozu, kao alternativu apoptozi ili nekrozi. Nakon aktivacije od strane CXCL8 ili lipopolisaharida, neutrofili mogu osloboditi sadržaj jezgre, istiskujući velike niti dekondezirane jezgrine DNK i pripadajuće proteine u izvanstaničnu tekućinu. Oni tvore mrežu izvanstaničnih vlakana koja djeluje kao neutrofilna izvanstanična zamka (eng. neutrophil extracellular trap, NET). Mreža izvanstanične DNK je obavijena antimikrobnim bjelančevinama; uključujući histone i komponente granula poput elastaze, mijeloperoksidaze, laktoferina i želatinaze, obzirom da se granule raspadaju istovremeno s raspadanjem jezgre. Na taj način DNK mreža osim sposobnosti da fizički zarobi bakteriju, također je može ubiti. Na mjestima akutne upale nalazi se obilje NET-ova, a mogu se naći i u mastitičnom mlijeku. Zarobljavaju i ubijaju veliki broj različitih bakterija, zatim gljivica poput *Candida albicans* i protozoa kao što je *Leishmania amazonensis* i *Eimeria bovis*. NET-ovi mogu biti od izrazite važnosti u zadržavanju prodirućih mikroorganizama, jer ponašajući se kao fizičke barijere i hvatajući veliki broj bakterija sprečavaju njihovo širenje (Hart i sur., 2000.).

## 5.4. Ingestija

Kako se neutrofilu kreću prema izvoru kemotaktičnih tvari, njihovi pseudopodiji se pokreću prvi, a praćeni su ostatkom stanice. Citosol pseudopodija sadrži mrežu aktinskih i miozinskih niti, čije stanje određuje fluidnost citoplazme. Kada se neutrofil susretne sa bakterijom, pseudopodiji se spajaju i okruže ju, a samo povezivanje se odvija na mjestima između opsonina na mikroorganizmu i receptora na površini neutrofila. Kada se protutijelima opsonizirani mikroorganizam veže na CD32 receptor na neutrofilu, potiče polimerizaciju aktina. Rezultat polimerizacije je proširenje aktinom bogatih pseudopodija što omogućava gutanje patogene čestice (Piskin i Nuzzo, 2002.).



Slika 7. Fagocitoza stanice kvasca

Izvor: preuzeto s [http://41.media.tumblr.com/9bc36d447b1f71417ad2a427d4fada0b/tumblr\\_mpbl74A5g51ranarlo3\\_1280.jpg](http://41.media.tumblr.com/9bc36d447b1f71417ad2a427d4fada0b/tumblr_mpbl74A5g51ranarlo3_1280.jpg) (1.9.2015.).

Pri fagocitozi u kojoj posreduju komponente komplekta patogene čestice budu unesene u stanicu bez formiranja pseudopodija, što znači da se ingestija kod ovog načina fagocitoze razlikuje od prethodno opisane fagocitoze posredovane protutijelima (Slika 7). Vežanje ovih receptora omogućuje oblikovanje strukture nalik čašici, a bakterija se uvuče

u stanicu koja ju proguta te ju zatvara u vakuolu koja se tada naziva fagosom. Lakoća ingestije ovisi o svojstvima površine bakterije. Neutrofili lako oblažu lipidne površine, tako da mogu lako progutati hidrofobne bakterije poput *Mycobacterium tuberculosis*. Za razliku od toga, uzročnik upale pluća kod ljudi, bakterija *Streptococcus pneumoniae*, posjeduje hidrofilnu kapsulu, pa ju neutrofili teško ingestiraju, osim su slučaju opsonizacije hidrofobnim tvarima. Neutrofilna membrana zatvara se oko bakterije spojene na njegove receptore, tako da se ona sada nalazi unutar neutrofila.

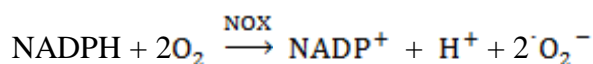
Treći način ingestije odvija se kod bakterija kao što su *Legionella pneumophila* i *Borrelia burgdorferi*, prilikom čega se jedan pseudopodij može obaviti nekoliko puta oko patogenog organizma (Del Rio i sur., 2001.).

## **5.5. Digestija**

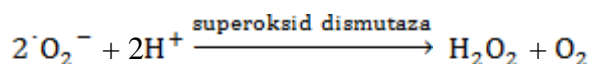
Neutrofili uništavaju unesene bakterije kroz dva različita procesa. Jedan uključuje stvaranje jakih oksidansa reakcijama koje pripadaju oksidativnom metabolizmu neutrofila. Drugi proces podrazumijeva otpuštanje lizirajućih enzima i antimikrobnih peptida iz unutarstaničnih granula.

### ***Oksidativni metabolizam neutrofila***

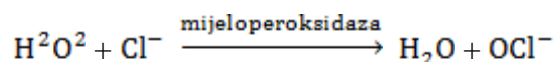
Nekoliko sekundi nakon vezanja bakterije neutrofili povećavaju utrošak kisika za skoro sto puta. To proizlazi iz aktivacije enzimskog kompleksa NADPH oksidaze (NOX) koji se nalazi na površini stanice. Komponente NOX kompleksa u stanicama su inače razdvojene, a njihovo sastavljanje i aktivaciju potiče djelovanje TNF- $\alpha$  ili nekih drugih stimulatora upale na neutrofile. Aktivirani NOX kompleks pretvara NADPH (reducirani oblik NADP, odnosno nikotinamid adenin dinukleotid fosfata) u NADP<sup>+</sup> uz otpuštanje elektrona. Molekula kisika prima elektron i postaje superoksidni anion:



Dva superoksidna aniona reagiraju spontano, odnosno dismutiraju, te proizvode molekulu vodikova peroksida  $\text{H}_2\text{O}_2$ , uz djelovanje enzima superoksid dismutaze:



Vodikov peroksid se pretvara u baktericidne spojeve pod utjecajem enzima mijeloperoksidaze. Mijeloperoksidaza katalizira reakciju između vodikovog peroksida i unutarstaničnih halogenih iona ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ) ili tiocijanata ( $\text{SCN}^-$ ) i nastaje:



$\text{Cl}^-$  iz plazme se koristi na većini upalnih mjesta osim u mlijeku i slini, gdje je u reakcijama zastupljen  $\text{SCN}^-$ . Glavni produkt oksidativnog metabolizma neutrofila je hipoklorna kiselina ( $\text{HOCl}$ ). Hipoklorna kiselina se zbog svoje reaktivnosti brzo iskoristi u mnogim reakcijama. Dok god ima dostupnog  $\text{H}_2\text{O}_2$  koji se u neutrofilima stvara do 3 sata nakon aktivacije, mijeloperoksidaza će proizvoditi  $\text{HOCl}$ .  $\text{HOCl}$  uništava bakterije denaturirajući i skupljajući njihove bjelančevine, zatim oksidacijom njihovih lipida, a povećava i baktericidno djelovanje lizosomalnih enzima. Gore opisani metabolizam neutrofila nazivamo respiratorna eksplozija (eng. Respiratory burst). To je proces u kojem neutrofili povećavaju potrošnju kisika putem aktivnosti NADPH-oksidge pri čemu nastaju superoksidni anion i vodikov peroksid. Iz tih metabolita kisika nastaju i druge reaktivne kisikove vrste koje imaju jako antimikrobno djelovanje, ali oni također mogu uništiti okolno tkivo te potaknuti apoptozu u drugim imunskim stanicama (Weinmann i sur., 1999.).

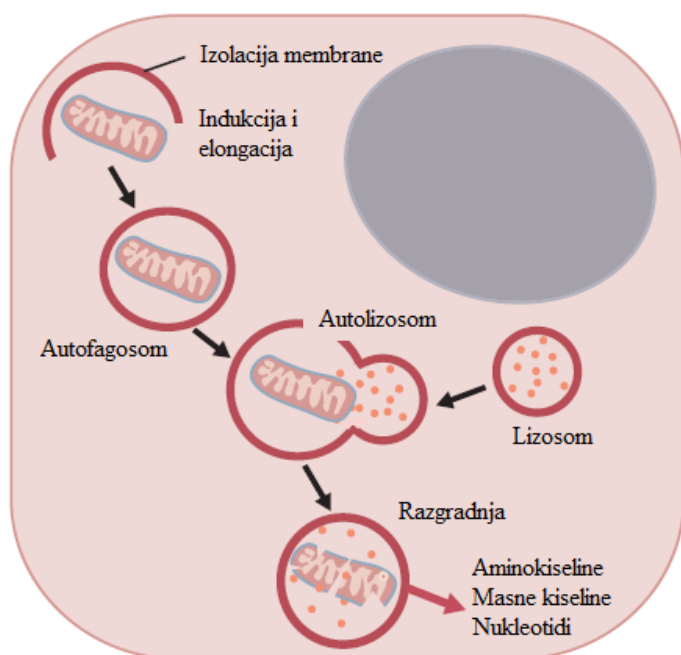
Aktivnost neutrofila u vezi intenziteta navedenih reakcija razlikuje se među pojedinim vrstama domaćih životinja. Primjer su ovce, čiji neutrofili proizvode manje superoksida nego neutrofili kod goveda.

Neutrofili također posjeduju sigurnosne mehanizme za detoksikaciju oksidansa te kako bi što više smanjili kolateralnu štetu. Zato sadrže velike količine glutaciona koji

reducira oksidanse. Njihove reakcije također ometaju antioksidansi poput askorbata i vitamina E (Del Rio i sur., 2001.).

### ***Lizirajući enzimi***

Kao što je već opisano, fagocitoza podrazumijeva unos, ubijanje i digestiju izvanstaničnih čestica kao što su bakterije. Stanice mogu također uništiti mikroorganizme ili dotrajale vlastite stanične organele i bjelančevine procesom koji se naziva autofagija. Autofagija je oblik stanične samo-razgradnje (Slika 8). Da bi strana čestica ili oštećena organela bila razgrađena, mora biti zatvorena unutar dvostruke membrane koja tvori citosolnu vezikulu, a kao takva naziva se autofagosom. On se spaja sa lizosomima, čiji enzimi potom razgrađuju sadržaj autofagosoma. Nastale makromolekule se otpuštaju nazad u citosol, i dostupne su za ponovnu uporabu.

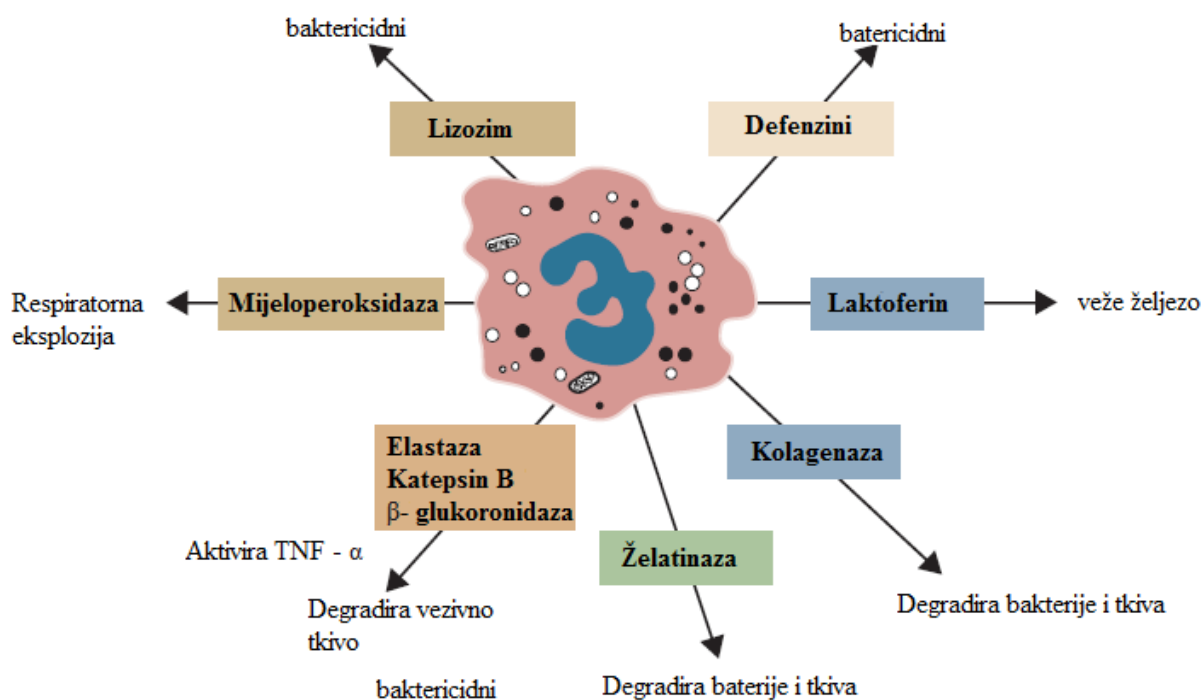


Slika 8. Proces autofagije. Samoingestija dijelova stanice. Autofagosom se stvara u citoplazmi i zatvara organele ili mikroorganizme koji trebaju biti uništeni. Lizosom se stapa s autofagosomom te tvori autolizosom. Sadržaj se razgrađuje i prerađuje. Ovo je način uklanjanja starih, oštećenih organela kao i unutarstaničnih bakterija.

*Izvor:* preuzeto od Tizard, 2012.

Autofagiju može pokrenuti gladovanje kako bi procesima razgradnje nastale aminokiseline potrebne za daljnju sintezu bjelančevina, ali može biti i potaknuta s ciljem uklanjanja određenih dotrajalih organela poput mitohondrija, zatim oštećenih bjelančevina ili unutarstaničnih patogenih uzročnika. Poremećaji autofagije javljaju se kod karcinoma, neurodegeneracija, zaraza i starenja.

Nakon što neutrofil ingestira bakteriju, njegove granule koje se nazivaju lizosomi gibaju se kroz citoplazmu, spajaju se s dozrelim fagosomom i oslobađaju svoje enzime. Cijela vakuola se tada naziva fagolizosom (Tizard, 2012.). Povećanje ionske jakosti u fagolizosomu djeluje na otpuštanje elastaze i katepsina G iz njihovog sulfatiranog preteoglikanskog matriksa (Slika 9).



Slika 9. Enzimi i antimikrobne molekule u granulama citoplazme neutrofila.

Izvor: preuzeto od Tizard, 2012.

Ostali lizosomski enzimi podrazumijevaju lizozim, proteaze, acidne hidrolaze i mijeloperoksidazu. Enzimi koji se nakupljaju u fagosomima mogu razgraditi stanične stijenke bakterija i uništiti većinu mikroorganizama, ali postoje razlike u osjetljivosti bakterija na lizirajuće enzime. Gram-pozitivne bakterije osjetljive su na lizozim, i brzo se unište. No, gram-negativne bakterije poput *Escherichia coli* prežive nešto duže, s obzirom da im je stijenka otporna na digestiju. Laktoferin, vežući željezo na sebe može oduzeti



bakteriji ovaj esencijalni element, te na taj način spriječiti razvoj bakterija. Neke bakterije poput *Brucella abortus* i *Listeria monocytogenes* mogu omesti dozrijevanje fagosoma na način da izbjegnu kontakt s lizosomskim enzimima te tako mogu nastaviti svoj rast unutar fagocitne stanice. Enzimi ispušteni iz neutrofila u tkiva odvajaju TNF- $\alpha$  s membrane makrofaga. TNF- $\alpha$  privlači i aktivira još više neutrofila (Tizard, 2012.).

## 6. SUDBINA NEUTROFILA

Neutrofili kao krajnje diferencirane stanice imaju kratki životni vijek, s visokom stopom spontane apoptoze. Imaju ograničenu količinu energije koja se ne može nadopuniti. Većina neutrofila preživi samo nekoliko dana, zbog čega su najaktivniji odmah nakon otpuštanja iz koštane srži, ali se brzo iscrpe i mogu podnijeti samo određeni broj fagocitoza. Apoptoza se odvija u prisutstvu upalnih stimulanata, pogotovo oksidansa. Proces također može uključiti i formiranje NET-ova egzocitirane DNK. Apoptotičke neutrofile uklanjaju stanice mononuklearnog fagocitnog sustava. Kada dendritičke stanice ingestiraju bakterijama inficirane apoptotičke neutrofile, dolazi do izlučivanja TGF- $\beta$  (eng. transforming growth factor beta), IL-6 i IL-23. Kao što je ranije navedeno, IL-23 potiče diferencijaciju Th17 stanica koje djeluju na proizvodnju više neutrofila. Suprotno tome, ingestija neinficiranog apoptotičkog neutrofila potiče izlučivanje IL-10 i TGF- $\beta$ , koji potiču proizvodnju T-stanica i supresiju imunih odgovora.

Tako se neutrofile može smatrati prvom linijom obrane organizma, zbog načina na koji brzo dopijevaju do mjesta prodora mikroorganizama, te njihovog trenutnog uništavanja, no nisu otporni na stalni napor. Druga linija obrane je mononuklearni fagocitni sustav. Neutrofili pri degranulaciji ili smrti otpuštaju DAMP-ove koji potiču regrutaciju i aktivaciju makrofaga i dendritičkih stanica, povećavajući imuni odgovor i prirođenog, i stečenog sustava (Ottonello i sur., 2002a).

### *Regulacija apoptoze i opstanak neutrofila*

Ozljeda tkiva uzrokuje brzu mobilizaciju neutrofila iz opće cirkulacije u tkiva. Životni vijek u tkivu infiltriranih neutrofila se znatno produži. Dvadeset i četiri sata nakon javljanja upalne reakcije, veliki broj neutrofila još uvijek je prisutan u upalnom području unatoč završetku ulaska neutrofila nakon 1- 4 sata (Savill i Haslett, 1994.). Podražaj GM-CSF, G-CSF, IFN-,IL-1,IL-2, IL-4, IL-6 i IL-15 može spasiti neutrofile od unaprijed programirane smrti, apoptoze. Citokini mogu spriječiti normalan ciklus apoptoze neutrofila, te produžiti njihov životni vijek. Specifični geni potrebni za apoptozu neutrofila nisu poznati. Ekspresija CD16 (FcRIIIb) na površini neutrofila u korelaciji je sa opstankom neutrofila i njihovom funkcijom (Moulding i sur., 1999.).

S obzirom na činjenicu da neutrofilu u krvotoku imaju vrlo kratak životni vijek, postavlja se pitanje mogu li protuupalni citokini odgoditi apoptozu neutrofila. Inhibitori transkripcije (aktinomycin D) i translacije (cikloheksimid) dodatno ubrzavaju stopu apoptoze neutrofila u krvi (Stringer i sur., 1996.). Ta činjenica ukazuje da opstanak ovih stanica zahtjeva bržu biosintezu bjelančevina. Razumijevanje apoptoze ili opstanaka neutrofila dolazi iz činjenice da procesi kojima se odgađa apoptoza neutrofila gotovo uvijek povećavaju ekspresiju gena. Citokin kao što je GM-CSF, koji snažno odgađa apoptozu neutrofila, inducira različite procese u neutrofilima, uključujući indukciju tirozin fosforilacije bjelančevina. Međutim, spašavanje neutrofila od apoptoze posredovano GM-CSF također može biti blokirano, barem djelomično, cikloheksamidima (Stringer i sur., 1996.). To bi značilo da citokinima posredovano sprječavanje apoptoze zahtijeva biosintezu proteina, moguće upravo onoga koji produžava život neutrofila.

## 7. UTJECAJ CITOKINA NA NEUTROFILE

*In vivo*, tkiva infiltrirana neutrofilima nikada nisu bez citokina, ove stanice su stalno okružene citokinima koji su im potrebni za sazrijevanje i opstanak. Do sada je većina funkcionalnih istraživanja temeljena na neutrofilima u perifernoj krvi koji su prethodno bili izloženi citokinima tijekom razvoja. Nekoliko je ključnih citokina, koji nisu izravno antimikrobni, ali aktiviraju i reguliraju široki spektar stanica i tkiva uključenih u urođeni, upalni i stečeni odgovor. Citokini djeluju kao hormonski proteini koji su proizvedeni kao odgovor imunološkog sustava na podražaje, a djeluju na različitim ciljnim stanicama.

Uz djelovanje bakterijskih proizvoda poput lipopolisaharida, neutrofilu izlučuju citokine kao što su: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, TNF- $\alpha$ , IL-6, CXCL8 (IL-8), IL-10 i TGF- $\beta$ . Iako pojedinačno neutrofilu proizvode vrlo male količine ovih citokina, oni se zadržavaju na upalnim mjestima tako da im je učinak značajan (Abdelilah i sur., 2001.).

Tri najvažnija citokina, IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$ , su glavni upalni citokin koji djeluje na lokalnoj razini u krvnim žilama i drugim stanicama za povećanje propusnosti krvnih žila, te pomažu aktivirati stanice na mjestima infekcije. IL-1, IL-6 i GM-CSF djeluju tijekom hematopoeze u koštanoj srži povećavajući proizvodnju neutrofila i drugih mijeloidnih stanica koje će doprinijeti uništavanju patogenih mikroorganizama. Aktivacija monocita, makrofaga i dendritičkih stanica kroz neke TLR-ove također uzrokuje proizvodnju IL-12 i IL-18 koji imaju ključnu ulogu u indukciji pomoćnih T-stanica koje će postati Th1 stanice koje će posebno poticati proizvodnju interferona.

Citokini mogu utjecati na sve čimbenike aktivacije neutrofila uključujući aktivaciju, oslobađanje citokina, oksidativnih produkata, prostaglandina i enzima te tako potpomoći urođenoj imunosti. Osim toga, također pomažu pokretanju stečenog imunskog odgovora.

### ***Interleukin-2***

Pojedina istraživanja pokazuju da ovaj citokin ne utječe na apoptozu neutrofila, dok druga pokazuju da IL-2 može odgoditi ovaj biološki proces. Ta se razlika može objasniti različitim eksperimentalnim uvjetima u kojima su korišteni različiti serumi za inkubaciju, a i broj inkubiranih stanica je bio različit. Važnu varijablu predstavlja gustoća stanica koja se koristi, jer kako su izvjestili Ottonello i sur. (2002.) supresija apoptoze neutrofila od

strane IL-6 ovisna je o koncentraciji neutrofila. Utjecaj gustoće stanica na procjenu modulacije apoptoze neutrofila IL-2, još uvijek se proučava. Utvrđeno je da IL-2 ne može izazvati fagocitozu neutrofila opsoniziranih ovčjih eritrocita *in vitro*. Također je utvrđeno da neutrofili sintetiziraju i otpuštaju IL-8 kao odgovor na IL-15, ali ne i IL-2. Nadalje, nuklearni faktor kappaB (eng. the nuclear factor NF-κB) DNK - vezujuće aktivnosti povećana je u ekstraktu jezgre neutrofila tretiranih IL-15. U jednom istraživanju *in vivo* kod ljudi oboljelih od uznapredovalog raka pronađeno je da IL-2 suprimira FcR ekspresiju (CD16) te kemotaksiju neutrofila (Jablons i sur., 1990.). U ovom slučaju, može se pretpostaviti da posredni učinak IL-2 tijekom liječenja *in vivo* može dovesti do aktivacije stanica drugačijih od neutrofila koje mogu sintetizirati topljive čimbenike koji će inhibirati odgovore neutrofila. Za razliku od drugih citokina, nikada se nije utvrđivao izravan *in vitro* učinak IL-2 na proizvodnju kisika, širenje stanice, oblik stanice, fagocitozu, sintezu RNK, apoptozu i ekspresiju komponenta IL-2R u neutrofilima. Međutim to ne isključuje mogućnost da IL-2 može aktivirati te stanice. IL-2 može potanuti GM-CSF sintezu bjelančevina izazvanu *de novo*. To ukazuje da IL-2 možda ne može sam potaknuti određene funkcije neutrofila, no može djelovati na već stimulirane stanice. Utvrđeno je da IL-2 posjeduje sposobnost da potakne bjelančevinu tirozin kinazu (Wei i Liu, 2000.). Uz to, otkriveno je da IL-2 inducira povezanost IL-2R, lyn i MAP kinazu ERK-1 u ovim stanicama. Međutim funkcionalne krajnje točke ovakve aktivacije tirozin kinaze ostaju nerazjašnjene, jer prema autorima nisu u korelaciji s bilo kojom od funkcija neutrofila (Abdelilah i sur. 2001.).

#### ***Interleukin-4***

Utvrđeno je da IL-4 može aktivirati polimorfonuklearne stanice (PMN) te da poboljšava djelovanje neutrofila prilikom uništavanja opsoniziranih bakterija, ali ne može izazvati respiratornu eksploziju. Međutim, IL-4 ovisno o koncentraciji povećava respiratornu eksploziju posredovanu peptidima formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP). To nije generalizirana pojava, jer IL-4 ne pojačava taj učinak ako je potaknut forbol miristat acetatom ili zimosanom. Istraživanjima Abdelilah i sur. (2001.) ustanovljeno je da IL-4 poboljšava sposobnost neutrofila da fagocitira opsonizirane eritrocite ovaca. Istraživanja su pokazala da IL-4 antagonizira biološko djelovanje IL-1 inducirajući ekspresiju i oslobađanje IL-1 receptora II. Otkriveno je da IL-4 inducira neutrofilno sazrijevanje stanica promijelocita HL-60.

Osim toga, IL-4 može odgoditi apoptozu neutrofila, potaknuti proizvodnju IL-8 te ga može inhibirati, no to je uočeno samo kod neutrofila induciranih LPS. Druga istraživanja pokazuju da IL-4 inhibira ekspresiju prostaglandina E2 (PGE2) induciranog LPS jednako dobro kao i proteina ciklooksigenaze-2 (COX-2) u neutrofilima (Abdelilah i sur., 2001.).

### ***Interleukin-7***

Malo je podataka koji se odnose na aktivaciju zrelih neutrofila IL-7. Utvrđeno je da rekombinantni ljudski IL-7 mobilizira mišje mijeloične ishodišne stanice iz koštane srži u krv, jetru i slezenu (Abdelilah i sur., 2001.) te da povećava broj nezrelih mišjih granulocita u slezeni. Zreli neutrofil konstitutivno izražavaju  $\alpha$  lanac, koji je poznat kao sastavni dio IL-7R, te je dokazana sposobnost IL-7 da oblikuje cijeli niz odgovora neutrofila i ekspresije komponente IL-7R (CDw127). Utvrđeno je da IL-7 nema sposobnost izazvati respiratornu eksploziju, fagocitozu, citoskeletnu reorganizaciju i sintezu RNK u stanicama. IL-7 ne može utjecati na apoptozu neutrofila. Odsutnost aktivacije objašnjava činjenica da zreli neutrofil ne izražavaju IL-7R lanac na svojoj staničnoj površini, što je to utvrđeno protočnom citometrijom (Abdelilah i sur., 2001.).

### ***Interleukin-9***

IL-9R se kao i IL-7R sastoji od  $\alpha$  – podjedinice i jednog dodatnog lanca IL-9R. Iako je lanac receptora IL-9R dovoljan da prenese visoki afinitet vezanja, oba lanca su potrebna za prijenos signala. Pretpostavlja se da zreli neutrofil ne izražavaju IL-9R lanac na površini stanice što je u korelaciji s manjkom sposobnosti da IL-9R izravno potakne proizvodnju kisika, rast stanica, promjenu oblika stanice, fagocitozu, sintezu RNK te sa nemogućnosti da utječe na apoptozu (Abdelilah i sur., 2001.).

### ***Interleukin-15***

IL-15 je nedavno otkriven citokin koji je poznat po tome što dijeli mnoga biološka djelovanja s IL-2 na T-stanicama, NK stanicama i B-stanicama. Preklapajuće djelovanje ne iznenađuje jer njihovi specifični receptori dijele dvije zajedničke komponente,  $\alpha$  i IL-2R (Girard i Beaulieu, 1997.). Treća podjedinica je za svaki receptor različita, a naziva se IL-2R i IL-15R. Ranije je utvrđeno da je IL-15 agonist neutrofila. Ovaj citokin potiče sintezu RNK, sintezu bjelančevina, fagocitozu i odgađanje apoptoze. Ovo je vezano uz činjenicu da PMN izražavaju nedavno otkrivene IL-15R podjedinice. IL-15 za razliku od IL-2 inducira proizvodnju jakih neutrofilnih kemoatraktanata IL-8 i aktivaciju NF- $\kappa$ B. Istraživanjima Stringera i sur. (1996.) utvrđeno je da IL-15 pojačava izlučivanje IL-8 neutrofilima te da je količina izlučenog povećana kostimulacijom toplinski inaktiviranom *Candidom albicans*. Stringera i sur. (1996.) također izvještavaju da IL-15 može potaknuti neutrofilnu respiratornu eksploziju u odgovoru, ali to nije dovoljno za aktiviranje proizvodnje superoksida u stanicama koje su izložene *C. albicans*. IL-15 povećava sposobnost neutrofila da fagocitiraju toplinom uništene *C. albicans* bez opsonizacije protutijelima ili proizvodima sustava komplementa. Također je otkriveno da IL-15 potiče usporednu sekreciju IL-1 i prirodnih inhibitora IL-1R i sIL-1RII neutrofila izoliranih iz zdravih i tumorskih domaćina. IL-15 također inducira IL i IL-1R sekreciju neutrofila iz zdravih neutrofila, a ne neutrofila kod pacijenata oboljelih od tumora. Stringera i sur. (1996.) potvrdili su da PMN očituju IL-1R i da IL-15 potiče *de novo* sintezu IL-1R.

### ***Interleukin-21***

Do danas ne postoje podaci dostupni u literaturi koji se odnose na ulogu IL-21 u fiziologiji stanica neutrofila. Istraživanje Hart i sur. (2000.) upućuju na to da ovaj citokin ne utječe na fagocitozu i apoptozu neutrofila.

## 8. ZAKLJUČAK

Imunološki sustav je sustav organa koji štiti organizam od napada stranih mikroorganizama, a sastoji se od organa smještenih po cijelom tijelu, te stanica koje sudjeluju u imunosnim reakcijama. Razlikujemo dvije vrste imunosti: nespecifičnu (prirođenu) i specifičnu (stečenu) imunost. Obje imunosti međusobno ovise jedna o drugoj. Nespecifična imunost ima najvažniju ulogu u očuvanju antigenskog i genskog integriteta i individualnosti organizma. Nespecifična imunost jest otpornost organizma na štetni utjecaj neke tvari i bez prethodnog dodira s njom. Temelji se na anatomskim, fiziološkim, fagocitnim zaprjekama i na upali.

U ovome radu pažnja je usmjerena na upalni proces kojemu je glavni cilj osigurati da fagocitne stanice što prije i učinkovitije presretnu i unište strane mikroorganizme. Neutrofili migriraju iz krvotoka, prolaze kroz endotelne stanice, aktiviraju se te privučeni kemotaktičnim molekulama usmjereno kreću prema mikroorganizmima. Mikroorganizmi se uvlače u neutrofile procesom ingestije, te slijedi proces digestije odnosno uništavanja mikroorganizama lizirajućim enzimima i antimikrobnim peptidima.

Obzirom na navedeno imunosni sustav je savršen sklad i suradnja svih stanica koje održavaju organizam u ravnoteži pružajući mu potrebnu zaštitu.



## 9. POPIS LITERATURE

1. Abdelilah, S., Latifa, K., Esra, N. (2001.): Functional expression of IL-9 receptor by human neutrophils from asthmatic donors: Role in IL-8 release. *Journal Immunology*, 166: 2768-2774.
2. Andreis, I., Batinić, D., Čulo, F., Grčević, D., Lukinović-Škudar, V., Marušić, M., Taradi, M., Višnjic, D. (2010.): *Imunologija*. Medicinska naklada Zagreb.
3. Areschoug, T. i Gordon, S. (2009.): Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 11: 1160-1169.
4. Beutler, B., i Rietschel, E. T. (2003.): Innate immune sensing and its roots: The story of endotoxin. *Nature Reviews Immunology*, 3: 169-176.
5. Boehm, T., Bleul, C. C. (2007.): The evolutionary history of lymphoid organs. *Nature Immunology*, 8: 131-135.
6. Borregaard, N. (2010.): Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 33: 657-679.
7. Call, D. R. (2000.): Differential local and systemic regulation of the murine chemokines KC and MIP2. *Shock*, 15: 278-284.
8. Chroneos, Z. C. (2010.): Pulmonary surfactant: An immunological perspective. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 25: 13-26.
9. Colotta, F., Re, F., Muzio, M. (1994.): Interleukin-1 type II receptor: A decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science*, 261: 472-475.
10. Dallegri, F., Ottonello, L. (1997.): Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflammation Research*, 46: 382-391.

11. Del Rio, L., Bennouna, S., Salinas, J., Denkers, E. Y. (2001.): CXCR2 deficiency confers impaired neutrophil recruitment and increased susceptibility during *Toxoplasma gondii* infection. *Journal Immunology*, 167: 6503-6509.
12. Dunican, A., Grutkoski, P., Leuenroth, S., Ayala, A., Simms, H. H. (2000.): Neutrophils regulate their own apoptosis via preservation of CXC receptors. *Journal of Surgical Research*, 90: 32-38.
13. Fujie, K., Shinguh, Y., Inamura, N., Yasumitsu, R., Okamoto, M., Okuhara, M. (1999.): Release of neutrophil elastase and its role in tissue injury in acute inflammation: Effect of the elastase inhibitor, FR134043. *The European Journal of Pharmacology*, 374: 117-125.
14. Girard, D., Beaulieu, A. D. (1997.): Absence of the IL-7 receptor component CDw127 indicates that gamma(c) expression alone is insufficient for IL-7 to modulate human neutrophil responses. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 83: 264-271.
15. Hart, S. P., Ross, J. A., Ross, K., Haslett, C., Dransfield, I. (2000.): Molecular characterization of the surface of apoptotic neutrophils: Implications for functional downregulation and recognition by phagocytes. *Cell Death and Differentiation*, 7: 493-503.
16. Hickey, M. J., Kubes, P. (2009.): Intravascular immunity: the hostpathogen encounter in blood vessels. *Nature reviews immunology*, 9: 364-375.
17. Jablons, D., Bolton, E., Mertins, S. (1990.): IL-2-based immunotherapy alters circulating neutrophil Fc receptor expression and chemotaxis. *The Journal of Immunology* 144: 3630–3636.
18. Lee, W. L., Downey, G. P. (2001.): Neutrophil activation and acute lung injury. *Current opinion in critical care*, 7: 1-7.

19. Mercer-Jones, M. A. (1999.): Neutrophil sequestration in liver and lung is differentially regulated by C-X-C chemokines during experimental peritonitis. *Inflammation*, 23: 305-319.
20. Moore, T. A. (2000.): Bacterial clearance and survival are dependent on CXC chemokine receptor-2 ligands in a murine model of pulmonary *Nocardia asteroides* infection. *Journal Immunology*, 164: 908-915.
21. Moulding, D. A., Hart, C. A., Edwards, S. W. (1999.): Regulation of neutrophil Fcγ<sub>3</sub> (CD16) surface expression following delayed apoptosis in response to GM-CSF and sodium butyrate. *Journal of Leukocyte Biology*, 65: 875-882.
22. Ottonello, L., Frumento, G., Arduino, N. (2002a): Delayed neutrophil apoptosis induced by synovial fluid in rheumatoid arthritis: Role of cytokines, estrogens, and adenosine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 966: 226-231.
23. Ottonello, L., Frumento, G., Arduino, N. (2002b): Differential regulation of spontaneous and immune complex-induced neutrophil apoptosis by proinflammatory cytokines. Role of oxidants, Bax and caspase. *Journal Leukocyte Biology*, 72: 125-132.
24. Piskin, G., Nuzzo, S. (2002.): Ultraviolet B radiation induces a transient appearance of IL-4 neutrophils, which support the development of Th2 responses. *Journal Immunology*, 168: 3732-3739.
25. Sanchez-Madrid, F., del Pozo, M. A. (1999.): Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *European Molecular Biology Organization Journal*, 18: 501-511.
26. Savill, J., Haslett, C. (1994.): Fate of neutrophils; in Hellewell PG, Williams TJ (ur.): *Immunopharmacology of Neutrophils*. San Diego, Academic Press, 295-314.
27. Shi, J., Gilbert, G. E., Kokubo, Y., Ohashi, T. (2001.): Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils. *Blood*, 98: 1226-1230.

28. Stringer, R. E., Hart, C. A., Edwards, S. W. (1996.): Sodium butyrate delays neutrophil apoptosis: Role of protein biosynthesis in neutrophil survival. *British Journal of Haematology*, 92: 169-175.
29. Terui, T., Ozawa, M., Tagami. (2000.): Role of neutrophils in induction of acute inflammation in T-cellmediated immune dermatosis, psoriasis: A neutrophil-associated inflammation-boosting loop. *Experimental dermatology*, 9: 1-10.
30. Thomas, J., Liu, F., Link, D. C. (2002.): Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. *Current opinion in Hematology*, 9: 183-189.
31. Tizard, I. (2012.): *Veterinary Immunology*. Elsevier Saunders, St. Louis Missouri.
32. Vestweber, D. (2000.): Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts. *The Journal of Pathology*, 190: 281-291.
33. Wei, S., Liu, J. H. (2000.): IL-2 induces the association of IL-2Rbeta, lyn, and MAP kinase ERK-1 in human neutrophils. *Immunobiology*, 202: 363-382.
34. Weinmann, P., Gaehtgens, P., Walzog, B. (1999.): Bcl-Xl-and Bax-mediated regulation of apoptosis of human neutrophils via caspase. *Blood*, 93: 3106-3115.
35. Xing, Z., Gauldie, J., Cox, G., Baumann, H., Jordana, M., Lei, X. F., Achong, M. K. (1998.): IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *Journal of Clinical Investigation*, 101: 311-320.
36. Yang, D., Chertov, O. (1999.): Beta-defensins: Linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*, 286: 525-528.
37. Zlotnik, A., Yoshie, O. (2000.): Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12: 121-127.

## 10. SAŽETAK

Imunosni sustav je sustav organa koji štiti organizam od napada stranih mikroorganizama. Razlikujemo dvije vrste imunosti: nespecifičnu (urođenu) i specifičnu (stečenu) imunost.

Nespecifična imunost djeluje i bez prethodnoga kontakta organizma sa određenim antigenom, te je usmjerena protiv svih antigena koji ulaze u organizam. Temelji se na brojnim mehanizmima, kao što su anatomske prepreke (koža, sluznice), fiziološke prepreke (pH, sadržaj kisika, temperatura), sustav komplementa, interferon, lizozim te stanični mehanizmi pretežito fagociti.

Osnovni mehanizmi djelovanja fagocita jesu endocitoza i pinocitoza topljivih tvari, te fagocitoza čestica i mikroorganizama. Neutrofili uništavaju unesene bakterije stvaranjem jakih oksidansa u reakcijama koje pripadaju oksidativnom metabolizmu neutrofila ili otpuštanjem lizirajućih enzima i antimikrobnih peptida iz unutarstaničnih granula.

Neutrofili iz krvotoka migriraju kroz endotelne stanice, nakon čega slijedi aktivacija. Aktivirani neutrofili usmjereno se kreću prema mikroorganizmima što je posljedica djelovanja kemotatičnih molekula. Proces fagocitoze započinje prijanjanjem, slijedi ingestija, te naposljetku digestija mikroorganizma uništava pomoću lizirajućih enzima i antimikrobnih peptida. Nakon djelovanja na mjestu upale slijedi apoptoza dotrajalih neutrofila. Apoptozu reguliraju brojni citokini. Nakon apoptoze, apoptotičke neutrofile uklanjaju stanice mononuklearnog fagocitnog sustava.

***Gljučne riječi:*** nespecifična imunost, fagocitoza, citokini, apoptoza

## 11. SUMMARY

The immune system is the system that protects the body against microorganisms. There are two types of immunity: nonspecific (innate) and specific (adaptive) immunity.

Innate immunity acts without prior contact with the antigen, and is directed against any antigen entering the body. It is based on a number of mechanisms, such as anatomical barriers (skin, mucosa), physiological barriers (pH, oxygen content, temperature), the complement system, interferon, lysozyme, and cellular defence consisting mainly of phagocytes.

Basic mechanisms of phagocytes are endocytosis and pinocytosis of soluble substances, and phagocytosis of solid particles and microorganisms. Neutrophils destroy bacteria by performing strong oxidant reactions belonging to the oxidative metabolism of neutrophils and release of lysing enzymes and antimicrobial peptides from intracellular granules.

The neutrophils migrate from the bloodstream through the endothelial cells and they must be activated to start the phagocytosis. Neutrophils are attracted to microorganisms as a result of the chemotactic molecules. Phagocytosis begins with adherence and continues with ingestion and finally ends up with digestion where microorganism is destroyed by lysing enzymes and antimicrobial peptides.

The apoptosis of neutrophils starts after the action at the inflammation site. Apoptosis is regulated by numerous cytokines. After apoptosis, apoptotic neutrophils are removed by the mononuclear phagocytic system.

**Key words:** innate immunity, phagocytosis, cytokines, apoptosis

## 12. POPIS SLIKA

*Stranica*

Slika 1. Vrste i nomenklatura krvnih stanica (Tizard, I. (2012.): Veterinary Immunology).....	7
Slika 2. Građa neutrofila (Tizard, I. (2012.): Veterinary Immunology).....	9
Slika 3. Glavni površinski receptori na neutrofilima i njihova funkcija (Tizard, I. (2012.): Veterinary Immunology).....	10
Slika 4. Faze adhezije i emigracije neutrofila iz krvotoka (Tizard, I. (2012.): Veterinary Immunology).....	13
Slika 5. Faze procesa fagocitoze (Tizard, I. (2012.): Veterinary Immunology).....	16
Slika 6. Oponizacija bakterije antitijelima i kompleментом (Tizard, I. (2012.): Veterinary Immunology).....	22
Slika 7. Fagocitoza stanice kvasca ( <a href="http://41.media.tumblr.com/9bc36d447b1f71417ad2a427d4fada0b/tumblr_mpbl74A5g51r-anarlo3_1280.jpg">http://41.media.tumblr.com/9bc36d447b1f71417ad2a427d4fada0b/tumblr_mpbl74A5g51r-anarlo3_1280.jpg</a> ), 1.9.2015 .....	24
Slika 8. Proces autofagije (Tizard, I. (2012.): Veterinary Immunology).....	27
Slika 9. Enzimi i antimikrobne molekule u granulama citoplazme neutrofila (Tizard, I. (2012.): Veterinary Immunology).....	28

## 13. POPIS TABLICA

*Stranica*

Tablica 1. Receptori za kemokine koji sudjeluju u aktivaciji neutrofila

Izvor: (Zlotnik, A., Yoshie, O. (2000.).....19



## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera

Diplomski rad

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Sveučilišni diplomski studij, Specijalna zootehnika

## ULOGA FAGOCITA U IMUNOSNOJ OBRANI ŽIVOTINJSKOG ORGANIZMA

Ivana Vujnović

**Sažetak:** Imunološki sustav je sustav organa koji štiti organizam od napada stranih mikroorganizama. Razlikujemo nespecifičnu i specifičnu imunost. Nespecifična imunost djeluje bez prethodnog kontakta organizma sa antigenom. Nespecifična imunost se temelji na mehanizmima kao što su anatomske prepreke, fiziološke prepreke, sustav komplemента, interferon, lizozim, te stanični mehanizmi (fagociti). Neutrofili iz krvotoka migriraju kroz endotelne stanice, nakon čega se moraju aktivirati da bi započela fagocitoza. Tako se aktivirani neutrofili usmjerenom kreću prema mikroorganizmima, što je posljedica djelovanja kemotatičnih molekula. Proces fagocitoze započinje ingestijom kod koje se mikroorganizam uvlači u neutrofil, završava digestijom kod koje se probava mikroorganizma uništava lizirajućim enzimima i antimikrobnim peptidima. Nakon djelovanja na mjestu upale slijedi apoptoza neutrofila. Apoptozu reguliraju brojni citokini. Nakon apoptoze, apoptotičke neutrofile uklanjaju stanice mononuklearnog fagocitnog sustava.

**Rad je izrađen pri:** Poljoprivredni fakultet u Osijeku

**Mentor:** doc. dr. sc. Mislav Đidara

**Broj stranica:** 46

**Broj grafikona:** 0

**Broj slika:** 9

**Broj tablica:** 1

**Broj literaturnih navoda:** 37

**Broj priloga:** 0

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** nespecifična imunost, fagocitoza, citokini, apoptoza

**Datum obrane:**

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. prof. dr. sc. Marcela Šperanda, predsjednik
2. doc. dr. sc. Mislav Đidara, mentor
3. Mirela Pavić, dr. med. vet., član

**Rad je pohranjen u:** Knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Sveučilištu u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**

**Graduate thesis**

**Faculty of Agriculture**

**University Graduate Studies, Special Zootehnic**

### **ROLE OF PHAGOCYTES IMMUNE DEFENCE IN ANIMAL ORGANISM**

Ivana Vujnović

**Abstract:** The immune system is the system that protects the body against attacks by foreign microorganisms. There are two types of immunity: innate and adaptive immunity. Innate immunity acts without prior contact with the antigen of the organism. Innate immunity is based on a number of mechanisms such as anatomic barriers, physiological barriers, the complement system, interferon, lysozyme, and cellular mechanisms (phagocytes). The neutrophils migrate from the bloodstream through the endothelial cells, and they must be activated to start the phagocytosis. Activated neutrophils have directed movement to microorganisms as a result of the chemotactic molecules. The process of phagocytosis begins with ingestion where the microorganism is drawn into the neutrophil, and ends with digestion in which the microorganisms is destroyed by lysing enzymes and antimicrobial peptides. Apoptosis is regulated by numerous cytokines. After apoptosis, apoptotic neutrophils are removed by mononuclear phagocytic system.

**Thesis performed at:** Faculty of Agriculture in Osijek

**Mentor:** doc. dr. sc. Mislav Đidara

**Number of pages:** 46

**Number of figures:** 9

**Number of tables:** 1

**Number of references:** 37

**Number of appendices:** 0

**Original in:** Croatian

**Key words:** innate immunity, phagocytosis, cytokines, apoptosis

**Thesis defended on date:**

**Reviewers:**

1. prof. dr. sc. Marcela Šperanda, predsjednik
2. doc. dr. sc. Mislav Đidara, mentor
3. Mirela Pavić, dr. med. vet., član

**Thesis deposited at:** Library, Faculty of Agriculture in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Kralja Petra Svačića 1d.