RECEPTORY DLA HEMOGLOBINY. CZĘŚĆ II. RECEPTOR ZMIATAJĄCY DLA HEMOGLOBINY JAKO SKŁADNIK WRODZONEJ ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ NA INFEKCJĘ

RECEPTORS FOR HEMOGLOBIN. PART II. HEMOGLOBIN SCAVENGER RECEPTOR AS A COMPONENT OF THE INNATE IMMUNE RESPONSE TO INFECTION

Jolanta ZUWAŁA-JAGIEŁŁO

Katedra Biochemii Farmaceutycznej, Akademia Medyczna we Wrocławiu

Streszczenie: Receptor CD163 monocytów/makrofagów wiążąc hemoglobinę i jej kompleksy z haptoglobiną (Hb-Hp), włącza ten receptor do grupy receptorów „zmiatających" dla hemoglobiny (HbSR). Poprzez wychwyt i internalizację hemoglobiny następuje usuwanie żelaza jako czynnika indukującego reakcje wolnorodnikowe oraz jako czynnika zwiększającego wzrost i patogenność bakterii. Rozpuszczalny receptor sCD163/HbSR jest odcinany z powierzchni monocytów przez molekularne wzorce związane z patogenami w tym samym czasie, w którym prawdopodobnie zachodzi hemoliza i tworzenie kompleksów Hb-Hp. Następstwa infekcji włączają dodatkowe funkcje, szczególnie przeciwzapalne, dla CD163/HbSR, poza wiązaniem i internalizacją kompleksów Hb-Hp. Początkowa wrodzona odpowiedź immunologiczna na infekcję wpływa na syntezę prozapalnych cytokin, by rekrutować nowe leukocyty do obszarów tkanki zapalnej oraz dodatkową produkcję przeciwzapalnych mediatorów, które pomagają ograniczyć miejscowe uszkodzenie tkanki. Mediatory przeciwzapalne, takie jak glikokortykoidy i interlukina-10, znacznie zwiększające ekspresję CD163/HbSR na powierzchni komórki, natomiast prozapalne cytokiny: czynnik martwicy nowotworów TNF-α i interferon-γ przeciwnie tłumią jego ekspresję. Zmniejszona ekspresja powierzchniowego receptora CD163/HbSR może dodatkowo zredukować udział zinternalizowanej Hb w komórkowej puli żelaza, tym samym ograniczając wzrost wewnątrzkomórkowych patogenów zależny od tego składnika.

Słowa kluczowe: hemoglobina, receptor CD163/HbSR, infekcja, wrodzona odpowiedź immunologiczna, haptoglobina.

Summary: CD163 binds haptoglobin-hemoglobin (Hp-Hb) complexes, implicating this receptor as a hemoglobin scavenger receptor (HbSR). Hemoglobin clearance prevents excessive toxicity by removing redox-reactive iron from the circulation, and removes Hb as a potential source of iron, a normally limiting nutrient for pathogen growth. Soluble CD163/HbSR is cleaved from the surface of monocytes by pathogens at the same time that hemolysis and Hp-Hb complex formation is likely to occur. The consequences of an infection implicate additional functions for the HbSR beyond binding and internalizing Hp-Hb

complexes, as this receptor is cleaved from the surface of monocytes during infections at a time when Hp-Hb complexes are forming, and complex clearance is imperative. The initial innate immune response to infection includes the release of proinflammatory cytokines to recruit new leukocytes to areas of inflamed tissue, in addition to the production of anti-inflammatory mediators such as IL-10, which help to limit damage to the local tissue environment. CD163/HbSR is involved in the resolution of inflammation; anti-inflammatory mediator IL-10 markedly increases expression of CD163/HbSR on the cell surface, and the pro-inflammatory cytokines TNF-α and IFN-γ suppress CD163/HbSR expression. Decreased surface expression of CD163/HbSR may reduce the contribution of Hb internalization to intracellular iron pools, thereby limiting the growth of intracellular pathogens dependent on iron for replication.

Key words: hemoglobin, receptor CD163/HbSR, infection, innate immune response, haptoglobin.

WSTĘP

Obfitość hemoglobiny (Hb), która zawiera 80% żelaza organizmu, czyni ją atrakcyjnym źródłem żelaza dla patogenów, pomimo jej lokalizacji w czerwonych krwinkach w układzie krążenia. Patogeny mogą uzyskać dostęp do wolnej hemoglobiny w drodze transcytozy przez warstwę nabłonka, zakażenia przez otwarte rany [31] lub ekspansji z ognisk zakażenia m.in. w sepsie [39]. W dodatku, niektóre Gram-dodatnie [2,15,1] i Gram-ujemne bakterie [26,9], wraz z licznymi gatunkami *Candida* [32] uwalniają podczas infekcji hemolizyny, które odpowiadają za obecność wolnej Hb we krwi krążącej i tkance śródmiąższowej. Chociaż Hb jest szybko wiązana przez haptoglobinę w kompleks (Hb-Hp), to tworzenie tego kompleksu nie zawsze hamuje zdolność patogenów do wykorzystania hemoglobiny jako źródła żelaza [53]. Niektóre patogeny zachowują nawet większą zdolność wykorzystania żelaza zawartego w kompleksach Hb-Hp lub w cząsteczce hemu niż w samej hemoglobinie podczas infekcji [52,56].

Wychwyt i endocytoza Hb czy kompleksów Hb-Hp przez makrofagowy receptor CD163/HbSR jest pierwszą fizjologiczną funkcją przypisaną białku CD163 w grupie B receptorów zmiatających dla hemoglobiny (HbSR) [29]. Natomiast kontrola ekspresji receptora CD163/HbSR przez czynniki ostrej fazy sugeruje także immunoregulacyjne funkcje tej cząsteczki. Szersze informacje dotyczące powierzchniowego receptora CD163/HbSR zostały zamieszczone w części I cyklu pt.: „Receptory dla hemoglobiny: budowa i funkcje".

CD163/HbSR został niedawno zidentyfikowany jako rozpuszczalne białko w nadsączu kultur komórkowych monocytów/makrofagów i w osoczu krwi ludzkiej [57,44]. Rozpuszczalna forma CD163/HbSR (sCD163/HbSR) (ang. *soluble hemoglobin scavenger receptor*) powstaje przez odcinanie zewnątrzkomórkowej domeny od formy błonowej receptora CD163/HbSR. Podczas gdy forma błonowa CD163/HbSR jest głównie odpowiedzialna za usuwanie kompleksów Hb-Hp z krwi, rozpuszczalna forma sCD163/HbSR wydaje się być zaangażowana zarówno w usuwanie kompleksów Hb-Hp, jak i odpowiedź przeciwzapalną późnej fazy. Zaobserwowano, że żelazo (pochodzące z rozkładu Hb) jako kofaktor dużej liczby enzymów jest ważnym składnikiem odżywczym bakterii. Posocznica, zapalenie płuc oraz niektóre infekcje Gram-ujemne i Gram-dodatnie są skorelowane ze wzrostem

stężenia rozpuszczalnej formy sCD163/HbSR w osoczu krwi [57,44,33,54]. Stężenie sCD163/HbSR w osoczu odzwierciedla całkowitą pulę formy błonowej receptora CD163/HbSR, która może wzrastać w wyniku zwiększonej ekspresji komórkowej receptora przez indukcję czynnikami ostrej fazy [12,44].

Rozpoznanie patogenów przez makrofagi uczestniczące we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, jest oparte na odczytaniu tzw. wzorców molekularnych związanych z patogenami PAMP (ang. *patogen assosiated molecular patterns*), czyli konserwatywnych ewolucyjnie struktur występujących na powierzchni patogenów [7]. Do PAMP zaliczamy między innymi lipopolisacharyd (LPS), będący składnikiem ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych, bakteryjne DNA zawierające niemetylowane sekwencje CpG, a także dwuniciowe RNA wirusów. Struktury te są rozpoznawane przez tzw. receptory rozpoznające wzorce PRR (ang. *pattern recognition receptors*) znajdujące się na powierzchni układu monocytów/makrofagów, do których zaliczamy m.in. receptory Toll-podobne – TLR (ang. *toll-like receptors*) [7]. Niedawno przedstawiono, że ekspresja CD163/HbSR na monocytach jest regulowana podczas wczesnej odpowiedzi immunologicznej [59]. Aktywacja powierzchniowych receptorów TLR zapoczątkowuje odcinanie zewnątrzkomórkowej domeny receptora CD163/HbSR z powierzchni monocytów [21,59]. W tym kontekście rozpuszczalny receptor sCD163/HbSR może być fizjologicznie istotnym składnikiem wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Sekwestracja hemoglobiny, jako jeden z wielu mechanizmów odpowiedzi immunologicznej, może ograniczyć dostępność i wykorzystanie żelaza hemoglobinowego przez patogeny. Publikacja przedstawia najnowsze doniesienia na temat postępów w badaniach nad regulacją receptora CD163/HbSR, w warunkach aktywacji receptorów rozpoznających wzorce molekularne związane z patogenami, w powiązaniu z odpowiedzią cytokin na infekcje.

RECEPTORY TOLL: EKSPRESJA I REGULACJA

W strukturze drobnoustrojów istnieją cząsteczki niezbędne do ich przeżycia, które rozpoznawane są przez komórki układu odpornościowego przez receptory PRR. PAMP, do których należą m.in. składniki ścian komórkowych bakterii zarówno Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, produkty ich metabolizmu, struktury chemiczne wielu grzybów, kwasy nukleinowe (różniące się od ludzkiego DNA przede wszystkim brakiem metylacji wysp CpG), stanowią ligandy o dużym powinowactwie do receptorów TLR [24,7]. Ze względu na powinowactwo do specyficznych ligandów, TLR zgrupowano w pięciu podrodzinach: TLR2 (TLR1, TLR2, TLR6 lub TLR1/TLR2 oraz TLR2/TLR6), TLR3, TLR4, TLR5 oraz TLR9 (TLR7, TLR8, TLR9) [65,24].

Pierwszym zidentyfikowanym ligandem dla TLR był lipopolisacharyd, główny składnik ściany bakterii Gram-ujemnych, zwany również endotoksyną [46]. LPS jest jednym z silniejszych związków aktywujących układ immunologiczny i proces zapalny. Wykazano, że LPS wyizolowany z *Escherichia coli* aktywuje TLR4, podczas gdy LPS z *Porphyromonas gingivalis* stymuluje TLR2 prowadząc do aktywacji czynnika

transkrypcyjnego NF-κB (ang. *nuclear factor κB*) i indukcji syntezy cytokin prozapalnych [49]. LPS bakterii Gram-ujemnych, a szczególnie jego lipid A, poprzez TLR2 i przy współudziale TLR4 oraz cząsteczek CD80 i CD86, wzmaga syntezę czynnika martwicy nowotworów TNF-α (ang. *tumor necrosis factor α*), interleukiny (IL)-10, IL-12 szczególnie w ostrych infekcjach [37].

Bakteryjne lipoproteiny, peptydoglikan, kwas lipotejchojowy, zymosan, glikolipidy bakteryjne są ligandami receptora TLR2 [60]. TLR2 funkcjonuje także jako dimer z TLR6, a nawet z TLR1. Stwierdzono, że TLR1 przy współudziale TLR2, łącząc się m.in. z peptydoglikanem bakterii wzmaga odporność przeciwbakteryjną organizmu poprzez indukcję białka cytoplazmatycznego A20 i TNF-α, które w następstwie aktywują ubikwitynę, makrofagi i czynnik transkrypcyjny NF-κB [6]. TLR2 bierze dodatkowo udział wraz z TLR3 i TLR4 w stymulacji kinaz białkowych komórek zainfekowanych bakteriami Gram-dodatnimi [68].

Natomiast flagellina, białko rzęsek bakterii Gram-ujemnych, ligand dla receptora TLR5, jako jedyny z podrodziny wpływa na aktywację monocytów, komórek dendrytycznych (DC), komórek NK (ang. *natural killer cells*) oraz limfocytów T [51].

Podwójna nić wirusowego RNA – dsRNA (ang. *double-stranded RNA*) oraz syntetyczny Poli(I:C) należą do grupy ligandów receptora TLR3, który aktywuje układ odpornościowy głównie poprzez limfocyty T i komórki DC [55]. TLR3 jako mediator odporności przeciwwirusowej, indukuje syntezę cytokin interferonu (INF)-α i β, IL-6 i IL-12, poprzez które zwiększa cytotoksyczność komórek układu odpornościowego [34].

Białka pochodzenia endogennego, do których należą białka szoku cieplnego HSP60 oraz HSP70, Cp96, fibrynogen, aktywują receptory TLR4; natomiast kompleks chromatyna-IgG stymuluje receptory podrodziny TLR9 [30,61,16]. TLR4 po połączeniu z endogennymi HSP60 i HSP70 stymuluje układ odpornościowy aktywując komórki limfoidalne, głównie Th2, zwiększa syntezę TNF-α oraz IL-1 i IL-12, a także wpływa na aktywność komórek DC w migracji i wydzielaniu chemokin [61,16]. W innym doniesieniu Gao i Tsan [17] przeciwnie sugerują, że za aktywację receptorów TLR4 odpowiedzialny jest tylko LPS stanowiący zanieczyszczenie endogennego białka HSP60, a nie samo białko.

Receptory TLR stymulowane przez DNA zawierający niemetylowane sekwencje CpG, aktywują w pierwszej kolejności komórki DC, a następnie układ monocyty/makrofagi oraz komórki NK [65].

Receptory TLR mogą tworzyć funkcjonalne pary, homo- lub heterodimery, w interakcji z właściwym ligandem, co ma znaczenie w lepszym rozpoznaniu właściwego patogenu [45]. Przykładem jest receptor TLR2, który w postaci homodimerycznej rozpoznaje składniki ściany bakterii Gram-dodatnich (bakteryjne lipoproteiny, kwas lipotejchojowy, lipoarabinomannan, glikolipidy, poryny), natomiast składnik ściany drożdży – zymosan i lipopeptydy mykoplazm (zawierające dwie reszty kwasów tłuszczowych) TLR2 rozpoznaje w połączeniu z receptorem TLR6 [45]. Receptor TLR2 jest również niezbędny do rozpoznawania peptydoglikanu bakterii Gram-dodatnich, aczkolwiek nie jest jeszcze znany „partner", który mógłby utworzyć z nim heterodimer o takiej specy-

ficzności. Zasugerowano, że może być to receptor TLR10, który również występuje w postaci heterodimerycznej z receptorem TLR1 [20].

Receptory wrodzonej odporności TRL omówiono szerzej w licznych publikacjach [5,13,63].

ROZPUSZCZALNA FORMA RECEPTORA CD163/HbSR

Rozpuszczalna forma receptora, tj. sCD163/HbSR została po raz pierwszy zidentyfikowana w kulturach komórek monocytów/makrofagów i w osoczu krwi ludzkiej [57,44]. Rozpuszczalny receptor sCD163/HbSR to zewnątrzkomórkowy region, odcinany blisko segmentu transbłonowego formy błonowej receptora, który cechuje wszystkie odmiany sCD163/HbSR będące efektem rekombinacji domen zewnątrzkomórkowych (SRCR 1-9) [14,38].

Dowiedziono, że CD163/HbSR jest jedynym receptorem zmiatającym, który może być aktywnie odcinany z powierzchni makrofaga [59]. Zewnątrzkomórkowa część receptora CD163 jest odcinana z powierzchni ludzkich monocytów/makrofagów przez różne czynniki, do których należą m.in. estry forbolu (np. 12-mirystynian, 13-octan forbolu – PMA), lipopolisacharyd lub imunoglobuliny związane z receptorami Fc [59]. Po uwolnieniu z powierzchni komórki, rozpuszczalna forma sCD163/HbSR zachowuje pełną zdolność wiązania kompleksów Hb-Hp, chociaż w mniejszym stopniu niż forma błonowa receptora. sCD163/HbSR jest odcinany z powierzchni monocytów w tym samym czasie, w którym prawdopodobnie zachodzi hemoliza i tworzenie kompleksów Hb-Hp [43]. W wyniku enzymatycznego odcięcia części zewnątrzkomórkowej receptora, prawdopodobnie przez metaloproteinazy ADAMs (ang. A *disintegrin and metaloproteinases*), powstaje rozpuszczalna część receptora i związana z komórką część błonowa połączona z wewnątrzcytoplazmatyczną [43]. Wykazano także zależność pomiędzy aktywnością tkankowych inhibitorów metaloproteinaz, szczególnie TIMP-3 (ang. *tissue inhibitor of metaloproteinase number 3*) a proteolitycznym odcięciem części zewnątrzkomórkowej receptora CD163/HbSR [35].

Uważa sie, że sCD163/HbSR jest związany głównie ze stanami zapalnymi, natomiast ekspresja błonowego receptora, z przeciwzapalną alternatywną aktywnością makrofaga [38]. Rozpuszczalny sCD163/HbSR jest regulowany przez pro- i przeciwzapalne mediatory stanu zapalnego i może odgrywać główną rolę w późnej fazie odpowiedzi organizmu na stan zapalny. Ponadto, CD163/HbSR prawdopodobnie pełni funkcję wtórnego mediatora w przeciwzapalnej aktywności glikokortykosteroidów. Hogger i wsp. [23] przedstawili dowody wpływu sCD163/HbSR na regulację, indukowaną estrem forbolu, aktywacji ludzkich limfocytów T. Jednak obserwacja ta nie została potwierdzona dotychczas przez inne badania.

W piśmiennictwie spotyka się nieliczne dane dotyczące obecności, w warunkach fizjologicznych, stosunkowo wysokich stężeń sCD163/HbSR w osoczu krwi z wartością od 0,73 do 4,69 mg/dm^3 [43,44]. Badania biologicznych i okołodobowych

różnic w stężeniu sCD163/HbSR w grupie kontrolnej osób zdrowych, dowiodły niską osobniczą zmienność, z krytycznymi granicami +/– 30% wartości [43]. To może być szczególne interesujące w sytuacjach klinicznych np. w monitorowaniu przebiegu choroby albo cyklu terapeutycznego na postawie seryjnych pomiarów stężenia sCD163/HbSR w surowicy krwi.

Zwiększone poziomy sCD163/HbSR w surowicy oraz innych płynach ustojowych obserwowano w przebiegu szeregu chorób z nadmierną proliferacją komórek macierzystych szpiku m.in. sepsy, białaczki szpikowej i choroby Gauchera [44,41]. Istnieją koncepcje, iż za wzrost sCD163/HbSR w tych patologiach odpowiedzialna jest zwiększona ilość [47] i aktywacja monocytów, prowadząca do wzmożonej ekspresji i uwalniania sCD163/HbSR z pobudzonych komórek w pierwotnym miejscu zapalenia. Stwierdzono wyższe stężenia sCD163/HbSR w płynie maziowym niż w surowicy u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów RA (ang. *rheumatoid arthritis*) oraz spondyloartropatrię [4]. Obserwacje te sugerują, że sCD163/HbSR jest w przeważającej mierze odcinany od powierzchni makrofagów błony maziowej w miejscu zapalenia [35]. Dowiedziono jednak, że stężenie rozpuszczalnego sCD163/HbSR nie koreluje ze stężeniem białka C-reaktywnego CRP (ang. *C-reactive protein*) u chorych na RA, przez to nie odzwierciedla bezpośrednio ostrej fazy odpowiedzi zapalnej. Obserwowana skłonność do zwiększonego odcinania sCD163/HbSR przy zmniejszonej ekspresji powierzchniowego CD163/HbSR monocytów krwi i makrofagów tkankowych w warunkach ostrego zapalenia, została potwierdzona przez ustalenie odwrotnej korelacji między ekspresją receptora błonowego i stężeniem rozpuszczalnego CD163/HbSR w surowicy krwi grupy kontrolnej [12]. U pacjentów z podejrzewaną chorobą układu sercowo-naczyniowego, przewlekłym uszkodzeniem nerek, alergią, gruźlicą i u kobiet w ciąży, wykryto nieznaczny wzrost stężenia sCD163/HbSR związany ze zwiększoną zachorowalnością [2,3,28,64]. Wysokie stężenia sCD163/HbSR w surowicy stwierdzono w ostrych infekcjach (np. sepsie), celiakii, białaczce i w ostrym uszkodzeniu wątroby [40,11,22,41,42]. Zaprezentowano również badania wskazujące na podwyższone stężenia sCD163/HbSR podczas ostrej fazy syndromu aktywacji makrofagów MAS (ang. *macrophage activation syndrome*) związanej z samoistnym młodzieńczym reumatoidalnym zapaleniem stawów JIA (ang. *juvenile idiopathic arthritis*) [48].

CD163/HbSR JAKO SKŁADNIK WRODZONEJ ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ NA INFEKCJĘ

Ekspresja powierzchniowego receptora CD163/HbSR na monocytach jest regulowana przez mediatory przeciwzapalne, takie jak: glukokortykoidy i IL-10 oraz prozapalne cytokiny TNF-α i INF-γ [8,58]. Rozpuszczalna forma receptora sCD163/HbSR, wytwarzana przez odcinanie zewnątrzkomórkowej domeny CD163, wiąże wolną hemoglobinę czy kompleksy Hb-Hp, co jest ważne dla funkcjonowania organizmu w warunkach wewnątrznaczyniowej hemolizy zależnej od patogenów. W

szczególności, internalizacja wolnej Hb zapobiega wytwarzaniu reaktywnych form tlenu aktywujących prozapalne następstwa w komórce śródbłonka [50] oraz procesowi utleniania lipoprotein o małej gęstości LDL [18,69]. W badaniach modelowej endotoksemii wykazano redukcję ekspresji powierzchniowego CD163/HbSR monocytów i wzrost stężenia rozpuszczalnego sCD163/HbSR w osoczu [59]. Dlatego usunięcie wolnej Hb z osocza krwi może być tym mechanizmem, poprzez który CD16/HbSR wpływa na dostępność żelaza hemoglobinowego do zużycia przez patogeny oraz wywiera działanie przeciwzapalne.

PAMPs, pochodzące od bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, jak również struktur ściany komórkowej drożdży, są zdolne stymulować aktywne monocyty do odłączania formy sCD163/HbSR. LPS bakterii Gram-ujemnych aktywuje odłączanie CD163/HbSR i powoduje wzrost ilości rozpuszczalnego sCD163/HbSR w osoczu [66]. Zaobserwowano hamowanie interakcji LPS z kompleksem receptora TLR4 przez konkurencyjny inhibitor RsDLPA (ang. *lipid A derived from Rhodopseudomonas sphaeroides*). Syntetyczny lipopeptyd Pam3Cys oraz substancja cząsteczkowa zymosan A – produkt ściany komórkowej drożdży, znane z aktywacji, odpowiednio, TLR2/1 i TLR2/6, także powodowały odcięcie sCD163/HbSR, niezależnie od zanieczyszczenia LPS-em. Agonista TLR5, flagellina z *Salmonella typhimurium*, stymulowała monocyty do odłączania sCD163/HbSR w obecności bądź przy braku inhibitorów LPS [66]. Aktywacja CD163/HbSR wywołana przez flagellinę była częściowo blokowana przez siarczan polimyksyny B – inhibitor endotoksyny, co wskazuje, że TLR4 w połączeniu z aktywacją TLR5 pośredniczy mocniej we wzmożonej stymulacji niż aktywacja pojedynczymi agonistami TLR. W innym badaniu wzmożona stymulacja CD163/HbSR przez flagellinę zanieczyszczoną endotoksyną była połączona z podwyższoną produkcją cytokin IL-6 i IL-10 [67]. Tak więc równoczesna stymulacja przez dwa różne TLR wpływa na wzrost syntezy cytokin przez monocyty i na aktywację receptora CD163/HbSR.

Współudział cytokin w aktywacji CD163/HbSR zbadano z wykorzystaniem neutralizujących przeciwciał anty-IL-6 i anty-IL-10 [67]. Aktywacja powierzchniowego CD163/HbSR przez endotoksynę i Pam3Cys została całkowicie zniesiona przez neutralizujące przeciwciała anty-IL-10. Z drugiej strony blokada IL-6 i IL-10, z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych, hamuje stymulację receptora CD163/HbSR z udziałem flagelliny.

Analiza tych zagadkowych wyników prowadzi do wniosku, że częściowa odpowiedź przeciwzapalna wydobyta przez aktywację receptorami TLR może ograniczać dojrzewanie monocytów i migrację makrofagów z miejsc infekcji przed nabyciem przez nie wysokich stężeń antygenu. Indukcja receptora zmiatającego HbSR przez IL-10 ułatwiając „ładowanie" antygenu i zapoczątkowanie prezentacji antygenu może przystosować odpowiedź immunologiczną do czynników zakaźnych. Ponadto prawdopodobnie produkcja przeciwzapalnych mediatorów za pomocą aktywacji receptorów TLR po kontakcie z niepatogennymi komensalami pozwolą na oczyszczenie z infekcji i ochronę przed zbędnym uszkodzeniem tkanki. W tym kontekście, początkowa wrodzona odpowiedź immunologiczna na infekcję włącza syntezę prozapalnych cytokin, by rekrutować nowe leukocyty do obszarów tkanki zapalnej,

oraz indukuje przeciwzapalne mediatory, takie jak IL-10, które pomogą ograniczyć zapalenie zlokalizowane szczególnie na śluzówkach [62].

Bakteryjne kwasy nukleinowe zawierające niemetylowane sekwencje CpG (ligandy TLR9), aktywują w pierwszej kolejności komórki DC, a następnie komórki monocytów [65]. Istotnie, stymulacja monocytów agonistami wewnątrzkomórkowych TLR3, TLR7 lub TLR9, nie wpływa na odłączenie sCD163/HbSR z powierzchni monocytów, ale indukuje bezpośrednio syntezę prozapalnych cytokin [19].

Obecnie najważniejsze znaczenie we wrodzonej przeciwbakteryjnej i przeciwwirusowej odporności, przypisuje się interferonom. U transgenicznych mszy z knock-out'em genu kodującego INF-γ, stwierdzono zwiększoną podatność na infekcje wewnątrzkomórkowymi patogenami, w wyniku obniżonej indukcji odpowiedzi zapalnej. [36]. Wyniki badań potwierdziły, że stymulacja INF-γ ludzkich makrofagów, hamuje syntezę i uwolnienie IL-10 w następstwie aktywacji TLR2 [25]. Inni badacze dowodzą, że równoczesna stymulacja INF-γ i powierzchniowymi agonistami receptorów TLR pobudza makrofagi do uwolnienia o wiele wyższych stężeń prozapalnych cytokin, reaktywnych form tlenu i azotu, w porównaniu ze stymulacją makrofagów wyłącznie agonistami TLR lub INF-γ [8]. Weaver i wsp. [67] na podstawie własnych badań potwierdzili, że INF-γ całkowicie hamuje syntezę IL-10 przez ludzkie jednojądrzaste komórki krwi obwodowej PBMC (ang. *peripherial blood mononuclear cell*) w odpowiedzi na agonistów TLR2, TLR4 i TLR5. Stwierdzono, że blokada syntezy IL-10 jest w dużej mierze odpowiedzialna za efekt hamujący INF-γ we wzmożonej stymulacji CD163/HbSR. Jest godne uwagi, że stymulacja także egzogennym rekombinantem INF-γ (rINF-γ) makrofagów tłumi syntezę IL-10 w następstwie aktywacji TLR2. Dodatkowo trwałe obniżenie stymulacji CD163/HbSR z udziałem rINF-γ może być częściowo pogłębione przez stymulację egzogenną rekombinowaną -rIL-10, ale nie przez egzogenną rIL-6, co jest prawdopodobnie wynikiem zmiany ekspresji receptora IL-6 [27,10].

Supresja błonowej formy receptora CD163/HbSR z udziałem INF-γ jest odpowiedzią przeciwbakteryjną, która ogranicza replikację patogenów poprzez nieznany mechanizm. Można przypuszczać, że zmniejszona ekspresja formy błonowej receptora CD163/HbSR mogłaby zredukować udział Hb w komórkowej puli żelaza, a tym samym ograniczyć wzrost wewnątrzkomórkowych patogenów zależny od żelaza.

PODSUMOWANIE

Podsumowując rolę CD163/HbSR we wrodzonej odporności należy podkreślić, iż różne sygnały aktywacji makrofagów, poprzez oddziaływnie na rozpuszczalny lub powierzchniowy CD163/HbSR, wpływają na dostępność żelaza hemoglobinowego do zużycia przez patogeny. Zauważono, że odpowiedź monocytów na infekcję jest uzależniona od aktywacji PRR i miejscowego środowiska cytokin, które modulują rozwój odpowiedzi zapalnej. Ponadto badania podkreślają potencjalne znaczenie obniżenia ekspresji powierzchniowego receptora CD163/HbSR w warunkach

aktywacji makrofagów drogą klasyczną. W przyszłości terapia w kierunku zmniejszenia ekspresji CD163/HbSR może zostać użyta do ograniczenia wewnątrzkomórkowej replikacji patogenów znanych z zakażania makrofagów, a terapia rozpuszczalnym CD163/HbSR może prowadzić do ograniczenia wzrostu patogenów w stanach hemolizy i sepsy zależnych od patogenów. Szerokie, kliniczne stosowanie takich terapii służy dalszemu badaniu funkcji receptora CD163/HbSR.

LITERATURA

[1] ALLERBERGER F. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; **35**: 183–189.

[2] ARISTOTELI LP, MOLLER HJ, BAILEY B, MOESTRUP SK, KRITHARIDES L. The monocytic lineage specific soluble CD163 is a plasma marker of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2006; **148**: 342–347.

[3] AXELSSON J, MOLLER HJ, WITASP A, QURESHI AR, CARRERO JJ, HEIMBÜRGER O, BÁRÁNY P, ALVESTRAND A, LINDHOLM B, MOESTRUP SK, STENVINKEL P. Changes in fat mass correlate with changes in soluble sCD163, a marker of mature macrophages, in patients with CKD. *Am J Kidney Dis* 2006; **48**: 916–925.

[4] BAETEN D, MOLLER HJ, DELANGHE J, VEYS EM, MOESTRUP SK, DE KEYSER F. Association of CD163+ macrophages and local production of soluble CD163 with decreased lymphocyte activation in spondylarthropathy synovitis. *Arthritis Rheum* 2004; **50**: 1611–1623.

[5] BEUTLER BA. TLRs and innate immunity. *Blood* 2009; **1**: 1399–1407.

[6] BOONE DL, TURER EE, LEE EG, AHMAD RC, WHEELER MT, TSUI C, HURLEY P, CHIEN M, CHAI S, HITOTSUMATSU O, MCNALLY E, PICKART C, MA A. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol* 2004; **5**: 1052–1060.

[7] BROAD A, JONES DE, KIRBY JA. Toll-like receptor (TLR) response tolerance: a key physiological „damage limitation" effect and an important potential opportunity for therapy. *Curr Med Chem* 2006; **13**: 2487–2502.

[8] BUECHLER C, RITTER M, ORSÓ E, LANGMANN T, KLUCKEN J, SCHMITZ G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* 2000; **67**: 97–103.

[9] CHATTOPADHYAY K, BHATTACHARYYA D, BANERJEE KK. *Vibrio cholerae* hemolysin. Implication of amphiphilicity and lipid-induced conformational change for its pore-forming activity. *Eur J Biochem* 2002; **269**: 4351–4358.

[10] CHELBI-ALIX MK, WIETZERBIN J. Interferon, a growing cytokine family: 50 years of interferon research. *Biochimie* 2007; **89**: 713–718.

[11] DALY A, WALSH C, FEIGHERY C, O'SHEA U, JACKSON J, WHELAN A. Serum levels of soluble CD163 correlate with the inflammatory process in coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; **24**: 553–559.

[12] DAVIS BH, ZAREV PV. Human monocyte CD163 expression inversely correlates with soluble CD163 plasma levels. *Cytometry B Clin Cytom* 2005; **63**: 16–22.

[13] ERARD F, RYFFEL B. Toll like receptor – potential drug targets in infectious disease. *Infect Disord Drug Targets* 2008; **8**: 221–231.

[14] FABRIEK BO, DIJKSTRA CD, VAN DEN BERG TK. The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology* 2005; **210**: 153–160.

[15] FACKLAM R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* 2002; **15**: 613–630.

[16] FLOHE SB, BRUGGEMANN J, LENDEMANS S, NIKULINA M, MEIERHOFF G, FLOHE S, KOLB H. Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype. *J Immunol* 2003; **170**: 2340–2348.

[17] GAO B, TSAN MF. Recombinant human heat shock protein 60 does not induce the release of tumor necrosis factor alpha from murine macrophages. *J Biol Chem* 2003; **278**: 22523–22529.

[18] GRINSHTEIN N, BAMM VV, TSEMAKHOVICH VA, SHAKLAI N. Mechanism of low-density lipoprotein oxidation by hemoglobin-derived iron. *Biochemistry* 2003; **42**: 6977–6985.
[19] GURSEL M, VERTHELYI D, KLINMAN, DM. CpG oligodeoxynucleotides induce human monocytes to mature into functional dendritic cells. *Eur J Immunol* 2002 **32**: 2617–2622.
[20] HASAN U, CHAFFOIS C, GAILLARD C, SAULNIER V, MERCK E, TANCREDI S, GUIET C, BRI?RE F, VLACH J, LEBECQUE S, TRINCHIERI G, BATES EE. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol* 2005; **174**: 2942–2950.
[21] HINTZ KA, RASSIAS AJ, WARDWELL K, MOSS ML, MORGANELLI PM, PIOLI PA, GIVAN AL, WALLACE PK, YEAGER MP, GUYRE PM. Endotoxin induces rapid metalloproteinase-mediated shedding followed by up-regulation of the monocyte hemoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol* 2002; **72**: 711–717.
[22] HIRAOKA A, HORIIKE N, AKBAR SM, MICHITAKA K, MATSUYAMA T, ONJI M. Soluble CD163 in patients with liver disease: very high levels of soluble CD163 in patients with fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol* 2005; **40**: 52–56.
[23] HOGGER P, DREIER J, DROSTE A, BUCK F, SORG C. Identification of the integral membrane protein RM3/1 on human monocytes as a glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family (CD163). *J Immunol* 1998; **161**: 1883–1890.
[24] HOPKINS PA, SRISKANDAN S. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin Exp Immunol* 2005; **140**: 395–407.
[25] HU X, PAIK PK, CHEN J, YARILINA A, KOCKERITZ L, LU TT, WOODGETT JR, IVASHKIV LB. INF-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity* 2006; **24**: 563–574.
[26] HUGHES C, STANLEY P, KORONAKIS V. *E. coli* hemolysin interactions with prokaryotic and eukaryotic cell membranes. *Bioessays* 1992; **14**: 519–525.
[27] KMIEĆ Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2001; **161**: 1–151.
[28] KNUDSEN TB, GUSTAFSON P, KRONBORG G, KRISTIANSEN TB, MOESTRUP SK, NIELSEN JO, GOMES V, AABY P, LISSE I, MOLLER HJ, EUGEN-OLSEN J. Predictive value of soluble haemoglobin scavenger receptor CD163 serum levels for survival in verified tuberculosis patients. *Clin Microbiol Infect* 2005; **11**: 730–735.
[29] KRISTIANSEN M, GRAVERSEN JH, JACOBSEN C, SONNE O, HOFFMAN HJ, LAW SK, MOESTRUP SK. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001; **409**: 198–201.
[30] LEADBETTER EA, RIFKIN IR, HOHLBAUM AM, BEAUDETTE BC, SHLOMCHIK MJ, MARSHAK-ROTHSTEIN A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 2002; **416**: 603–607.
[31] LI X, KOLLTVEIT KM, TRONSTAD L, OLSEN I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev* 2000; **13**: 547–558.
[32] LUO G, SAMARANAYAKE LP, YAU JY. *Candida* species exhibit differential *in vitro* hemolytic activities. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 2971–2974.
[33] MADSEN M, MOLLER HJ, NIELSEN MJ, JACOBSEN C, GRAVERSEN JH, VAN DEN BERG T, MOESTRUP SK. Molecular characterization of the haptoglobin.hemoglobin receptor CD163. Ligand-binding properties of the scavenger receptor cysteine-rich domain region. *J Biol Chem* 2004; **279**: 51561–51567.
[34] MATSUMOTO M, FUNAMI K, OSHIUMI H, SEYA T. Toll-like receptor 3: a link between Toll-like receptor, interferon and viruses. *Microbiol Immunol* 2004; **48**: 147–154.
[35] MATSUSHITA N, KASHIWAGI M, WAIT R, NAGAYOSHI R, NAKAMURA M, MATSUDA T, HOGGER P, GUYRE PM, NAGASE H, MATSUYAMA T. Elevated levels of soluble CD163 in sera and fluids from rheumatoid arthritis patients and inhibition of the shedding of CD163 by TIMP-3. *Clin Exp Immunol* 2002; **130**: 156–161.
[36] MCCLARTY G, CALDWELL HD, NELSON DE. Chlamydial interferon gamma immune evasion influences infection tropism. *Curr Opin Microbiol* 2007; **10**: 47–51.
[37] MENG G. Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. *J Clin Invest* 2004; **113**: 1473–1480.
[38] MOESTRUP SK, MOLLER HJ. CD163: a regulated haemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. *Ann Med* 2004; **36**: 347–354.
[39] MOINE P, ABRAHAM E. Immunomodulation and sepsis: impact of the pathogen. *Shock* 2004; **22**: 297–308.

[40] MOLLER HJ, AERTS H, GR?NBAEK H, PETERSLUND NA, HYLTOFT PETERSEN P, HORNUNG N, REJNMARK L, JABBARPOUR E, MOESTRUP SK. Soluble CD163: a marker molecule for monocyte/macrophage activity in disease. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2002; **237**: 29–33.
[41] MOLLER HJ, DE FOST M, AERTS H, HOLLAK C, MOESTRUP SK. Plasma level of the macrophage-derived soluble CD163 is increased and positively correlates with severity in Gaucher's disease. *Eur J Haematol* 2004; **72**: 135–139.
[42] MOLLER HJ, MOESTRUP SK, WEIS N, WEJSE C, NIELSEN H, PEDERSEN SS, ATTERMANN J, NEXO E, KRONBORG G. Macrophage serum markers in pneumococcal bacteremia: Prediction of survival by soluble CD163. *Crit Care Med* 2006; **34**: 2561–2566.
[43] MOLLER HJ, PETERSEN PH, REJNMARK L, MOESTRUP SK. Biological variation of soluble CD163. *Scand J Clin Lab Invest* 2003; **63**: 15–21.
[44] MOLLER HJ, PETERSLUND NA, GRAVERSEN JH, MOESTRUP SK. Identification of the hemoglobin scavenger receptor/CD163 as a natural soluble protein in plasma. *Blood* 2002; **99**: 378–380.
[45] NISHIYA T, DEFRANCO AL. Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J Biol Chem* 2004; **279**: 19008–19017.
[46] OPAL SM, GLUCK T. Endotoxin as a drug target. *Crit Care Med* 2003; **31**: 57–64.
[47] PHILIPPIDIS P, MASON JC, EVANS BJ, NADRA I, TAYLOR KM, HASKARD DO, LANDIS RC. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses *in vitro*, in resolving skin blisters *in vivo*, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ Res* 2004; **94**: 119–126.
[48] PRADA A, SIEGEL DM, VILLANUEVA J, OLSON J, ILOWITE NT, BRUNNER HI, GRIFFIN T, GRAHAM TB, SHERRY DD, PASSO MH, RAMANAN AV, FILIPOVICH A, GROM AA. The diagnostic significance of soluble CD163 and soluble interleukin-2 receptor alpha-chain in macrophage activation syndrome and untreated new-onset systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; **56**: 965–971.
[49] PULENDRAN B, KUMAR P, CUTLER CW, MOHAMADZADEH M, VAN DYKE T, BANCHEREAU J. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses *in vivo. J Immunol* 2001; **167**: 5067–5076.
[50] REEDER BJ, WILSON MT. Hemoglobin and myoglobin associated oxidative stress: from molecular mechanisms to disease states. *Curr Med Chem* 2005; **12**: 2741–2751.
[51] REICHHART JM. TLR5 takes aim at bacterial propeller. *Nature Immun* 2003; **4**: 1159–1164.
[52] ROHDE KH, DYER DW. Analysis of haptoglobin and hemoglobin- haptoglobin interactions with the *Neisseria meningitidis* TonB-dependent receptor HpuAB by flow cytometry. *Infect Immun* 2004; **72**: 2494–2506.
[53] SADRZADEH SM, BOZORGMEHR J. Haptoglobin phenotypes in health and disorders. *Am J Clin Pathol* 2004; **121**: S97–S104.
[54] SCHAER DJ, SCHLEIFFENBAUM B, KURRER M, IMHOF A, BÄCHLI E, FEHR J, MOLLER HJ, MOESTRUP SK, SCHAFFNER A. Soluble hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor CD163 as a lineage-specific marker in the reactive hemophagocytic syndrome. *Eur J Haematol* 2005; **74**: 6–10.
[55] SCHULZ O, DIEBOLD SS, CHEN M, NÄSLUND TI, NOLTE MA, ALEXOPOULOU L, AZUMA YT, FLAVELL RA, LILJESTRÖM P, REIS E SOUSA C. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 2005; **433**: 887–892.
[56] SKAAR EP, HUMAYUN M, BAE T, DE BORD KL, SCHNEEWIND O. Iron-source preference of *Staphylococcus aureus* infections. *Science* 2004; **305**: 1626–1628.
[57] SULAHIAN TH, HINTZ KA, WARDWELL K, GUYRE PM. Development of an ELISA to measure soluble CD163 in biological fluids. *J Immunol Methods* 2001; **252**: 25–31.
[58] SULAHIAN TH, HOGGER P, WAHNER AE, WARDWELL K, GOULDING NJ, SORG C, DROSTE A, STEHLING M, WALLACE PK, MORGANELLI PM, GUYRE PM. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. *Cytokine* 2000; **12**: 1312–1321.
[59] SULAHIAN TH, PIOLI PA, WARDWELL K, GUYRE PM. Cross-linking of FcgammaR triggers shedding of the hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol* 2004; **76**: 271–277.
[60] TAKEUCHI O, AKIRA S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol* 2001; **1**: 625–635.

[61] VABULAS RM, AHMAD-NEJAD P, GHOSE S, KIRSCHNING CJ, ISSELS RD, WAGNER H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 2002; **277**: 15107–15112.
[62] VAN DER POLL T, COYLE SM, LEVI M, JANSEN PM, DENTENER M, BARBOSA K, BUURMAN WA, HACK CE, TEN CATE JW, AGOSTI JM, LOWRY SF. Effect of a recombinant dimeric tumor necrosis factor receptor on inflammatory responses to intravenous endotoxin in normal humans. *Blood* 1997; **89**: 3727–3734.
[63] VANDEWALLE A. Toll-like receptors and renal bacterial infections. *Chang Gung Med J* 2008; **31**: 525–537.
[64] VOGEL I, GROVE J, THORSEN P, MOESTRUP SK, ULDBJERG N, MOLLER HJ. Preterm delivery predicted by soluble CD163 and CRP in women with symptoms of preterm delivery. *BJOG* 2005; **112**: 737–742.
[65] WAGNER H. The immunology of the TLRs subfamily. *Trends Immun* 2004; **25**: 381–386.
[66] WEAVER LK, HINTZ-GOLDSTEIN KA, PIOLI PA, WARDWELL K, QURESHI N, VOGEL SN, GUYRE PM. Pivotal advance: activation of cell surface Toll-like receptors causes shedding of the hemoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol* 2006; **80**: 26–35.
[67] WEAVER LK, PIOLI PA, WARDWELL K, VOGEL SN, GUYRE PM. Up-regulation of human monocyte CD163 upon activation of cell-surface Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* 2007; **81**: 663–671.
[68] ZHANG Y, BLATTMAN JN, KENNEDY NJ, DUONG J, NGUYEN T, WANG Y, DAVIS RJ, GREENBERG PD, FLAVELL RA, DONG C. Regulation of innate and adaptive immune responses by MAP kinase phosphatase 5. *Nature* 2004; **430**: 793–797.
[69] ZUWAŁA-JAGIEŁŁO J, GÓRKA-DYNYSIEWICZ J. A Comparison of the Kinetics of Low? Density Lipoprotein Oxidation Induced by AGEs? Modified Hemoglobin or by Glycohemoglobin. *Adv Clin Exp Med* 2008; **17**: 531–537.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 01.04. 2009 r.
Przyjęto: 01.06. 2009 r.
Katedra Biochemii Farmaceutycznej, AM
50-139 Wrocław ul. Szewska 38/39
e-mail: jolanta@biochfarm.am.wroc.pl