

EXPRESSION OF „*EAT ME SIGNALS*“ ON NEUTROPHILS DURING RESOLUTION OF INFLAMMATORY RESPONSE INDUCED BACTERIALS TOXINS

EXPRESSE TZV. *EAT ME SIGNÁLŮ* NEUTROFILŮ V REZOLUCI ZÁNĚTLIVÉ REAKCE VYVOLANÉ BAKTERIÁLNÍMI TOXINY

Langrová T., Sládek Z.

Ústav anatomie, fyziologie a genetiky, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: xlangrov@node.mendelu.cz, sladek@mendelu.cz

ABSTRACT

Aim of this study was to determine whether CD 14 and CD 44 may serve as an *Eat Me Signals* during experimentally inflammatory response and provide changes of counts of apoptotic neutrophils. These receptors are necessary for recognition of apoptotic cells by macrophages during mastitis and maintenance health of mammary gland. The experiments were carried out in four clinically normal heifers, aged 15 to 18 months. PBS-treated mammary glands were set as a control to the infection. Then were used lipopolysaccharide and muramyl dipeptide as the inductor of inflammatory response. For analysis FACS Calibur flow cytometer was used. We established the increase counts of CD 14+ and CD 44+ neutrophils during resolution of induced acute inflammatory response. The results suggest the possibility of incidence CD 14 and CD 44 as an *Eat Me Signals* for macrophages.

Key words: neutrophils, apoptosis

ABSTRAKT

Cílem práce bylo prokázat, zda CD 14 a CD 44 slouží na neutrofilních granulocytech během zánětlivé odpovědi jako *Eat Me signály* a stanovit dynamiku apoptózy neutrofilů. Tyto receptory jsou nezbytné pro rozpoznání apoptotických buněk makrofágy během zánětlivé reakce a pro zachování zdraví mléčné žlázy. Pokus byl realizován na čtyřech klinicky zdravých jalovicích ve věku 15-18 měsíců. Byl použit model indukovaného influxu s intramamární aplikací lipopolysacharidu – LPS (peptidoglykan ze stěn G- bakterií) nebo muramyl dipeptidu – MDP (peptidoglykan G+ bakterií) oproti kontrole – PBS. K analýze CD 14+ a CD 44+ byl použit průtokový cytometr. Během rezoluce byly oproti iniciální fázi akutního zánětu zaznamenány zvýšené počty CD 14+ a CD 44+ neutrofilů. Z výsledků studie je patrné, že se během rezoluce CD 14 a CD 44 uplatňují jako tzv. *Eat Me signály* na apoptotických neutrofilech, a proto mohou být rozpoznány makrofágy a fagocytovány.

Klíčová slova: neutrofilny, apoptóza

ÚVOD

Neutrofilní granulocyty (neutrofilů) jsou odpovědné za nespecifickou obranu těla proti pronikajícím patogenům a představují jeden z typů volných buněk dutinového systému mléčné žlázy. Funkcí těchto buněk je eliminace bakteriálních patogenů během akutního zánětu. Neutrofilů fagocytující bakteriální patogeny, podléhají programované buněčné smrti, apoptóze. Způsob likvidace neutrofilů prostřednictvím apoptózy představuje rychlý a bezpečný mechanismus odstraňování neutrofilů, který směřuje k omezení poškození zanícené tkáně a podporuje rezoluci zánětu (Van Venrooy, 2000). Apoptóza neutrofilů představuje pouze první ze dvou kroků nutných pro zahájení rezoluce akutního zánětu (Savill, 1997). Tím druhým je pak fyzická eliminace apoptotických buněk zprostředkovaná fagocytózou lokálními makrofágy (Maszaros et al., 1999).

Chronologicky zahrnuje fagocytóza buněk s aktivovaným apoptotickým programem nejprve jejich rozpoznání a teprve pak pohlcení a degradaci těchto buněk makrofágy. Pro poznání apoptotických neutrofilů jsou důležité biochemické změny realizované na povrchu jejich cytoplazmatické membrány. Vznikají tzv. signální molekuly, „*Eat Me signály*“ (Akgul et al., 2001; Savill et al., 2003).

Rozpoznání apoptotických neutrofilů makrofágy vyžaduje na jedné straně existenci signálních molekul na povrchu apoptotických neutrofilů (*Eat Me signálů*) a na druhé straně existenci specifických receptorů na povrchu makrofágů (Savill, 1997).

Cílem práce bylo tedy prokázat, zda CD 14 a CD 44 slouží na neutrofilních granulocytech během zánětlivé odpovědi jako *Eat Me signály*.

MATERIÁL A METODIKA

Pokus byl realizován na čtyřech klinicky zdravých jalovicích, kříženkách holštýnského a českého strakatého plemene ve věku 15-18 měsíců. U zvířat byla indukována zánětlivá reakce mléčné žlázy inertním činidlem – PBS (phosphate buffered saline), komponenty buněčné stěny Gram pozitivních bakterií – MDP (muramyldipeptid) a Gram negativních bakterií – LPS (lipopolysacharid). Mléčné žlázy byly vypláchnuty v jednotlivých časových bodech (pravá přední 24 hod, pravá zadní 48 hod, levá přední 72 hod a levá zadní 168 hod) a buněčné suspenze byly zpracovány pro analýzu CD 14+ a CD44+ neutrofilů. Pro analýzu byl použit FCM (FACS Calibur apparatus, Beckton Dickinson, Mountain View, California, USA) a CELL QuestTM software (Beckton Dickinson, Mountain View, California, USA).

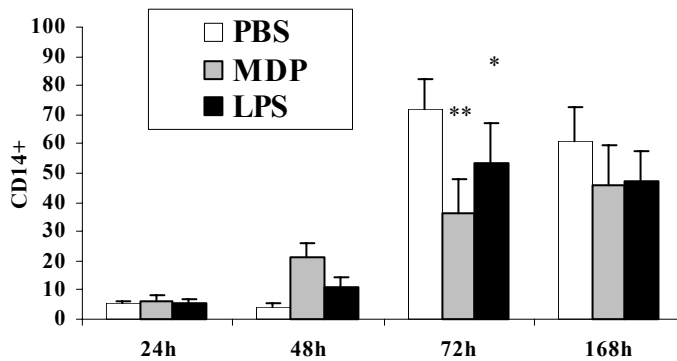
VÝSLEDKY A DISKUZE

Po indukci zánětlivé reakce byl zaznamenán nižší podíl CD14+ neutrofilů oproti kontrole (PBS) u MDP statisticky velmi významný ($P < 0,01$) a u LPS statisticky významný ($P < 0,05$). V obou případech šlo o časový bod 72 hodin po indukci zánětlivé odpovědi (graf č. 1).

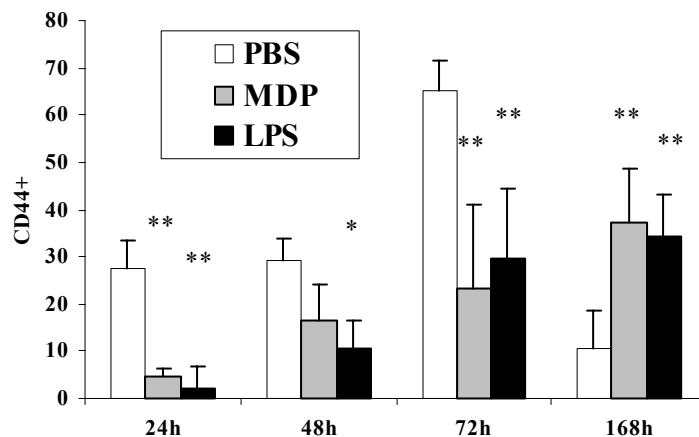
Nižší podíly CD 44+ neutrofilů po indukci MDP a LPS byly oproti PBS statisticky velmi významné ($P < 0,01$) v časových bodech 24 hodin a 72 hodin. V časovém bodě 48 hodin

byl zjištěn statisticky významně ($P < 0,05$) nižší podíl CD 44+ neutrofilů po indukci LPS. V časovém bodě 168 hodin byl oproti kontrole (PBS) zaznamenán statisticky velmi významně ($P < 0,01$) vyšší podíl CD 44+ neutrofilů po indukci MDP i LPS (graf č. 2).

Graf č. 1: CD 14+ neutrofilily



Graf č. 2: CD 44+ neutrofilily



Úloha membránového receptoru CD 14 v aktivaci buněk mléčné žlázy skotu byla studována u mastitidy vyvolané LPS. Bylo zjištěno, že zánětlivá reakce mléčné žlázy na LPS byla spojena s expresí CD 14 receptorů neutrofilů a makrofágů (Paape et al., 1996; Sládek et al., 2002). Exprese CD 14 receptoru výrazně závisí na stádiu zánětlivé odpovědi mléčné žlázy. V iniciální fázi byla zjištěna snížená exprese CD 14 (Paape et al., 1996), zatímco zvyšující tendence charakterizuje rezoluci zánětu (Sládek et al., 2002).

ZÁVĚR

Z výsledků zjištěných v tomto pokusu je patrné, že během rezoluce zánětu mléčné žlázy se CD 14 a CD 44 receptor neutrofilů uplatňují jako tzv. *Eat Me signály* a hrají významnou roli v rezoluci akutního zánětu mléčné žlázy a v zachování homeostázy organismu.

POUŽITÁ LITERATURA

Akgul, C., Moulding, D. A., Edwards, S. W. Molecular kontrol of neutrophil apoptosis. FEBS Letters, 2001. 487: 318-322.

Paape, M. J., Lilius, E. M., Wiitanen, P. A., Kontio, M. P., Miller, R. H. Intramammary defense against infections induced by Escherichia coli in cows. Am. J. Vet. Res. 1996. 57: 477-82.

Sládek, Z., Ryšánek, D., Faldyna, M. Activation of phagocytes during initiation and resolution of mammary gland injury induced by lipopolysaccharide in heifers. Vet. Res. 2002. 33: 191-204.

Maszaros, A. J., Reichner, J. S., Albina, J. E. Macrophage phagocytosis of wound neutrophils. J. Leukoc. Biol., 1999. 65: 35-42.

Savill, J. S. Recognition and phagocytosis of cell undergoing apoptosis. British Medical Bulletin, 1997. 53: 491-508.

Savill, J., Gregory, C., Haslett, C. Cell biology. Eat me or die. Science, 2003. 302: 1516-7.

Van Venrooy, W. Apoptosis and inflammation. Annals of Rheumatic Diseases, 2000. 59: 597-611.