

ANDRZEJ GÓRSKI

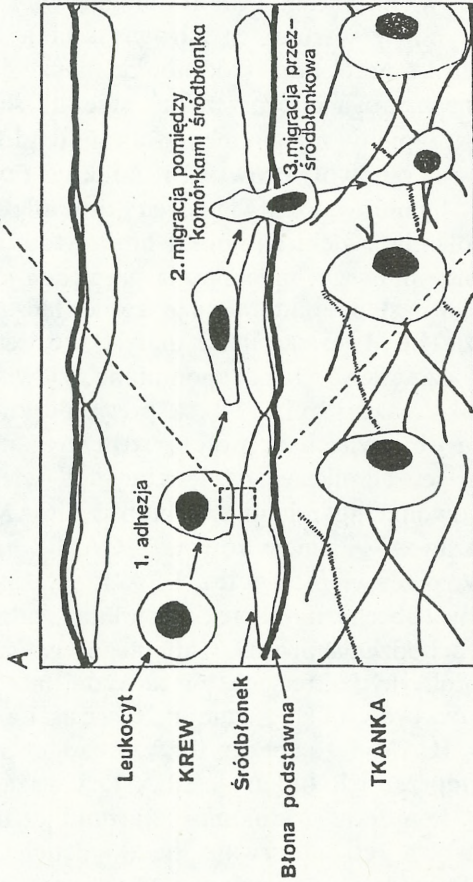
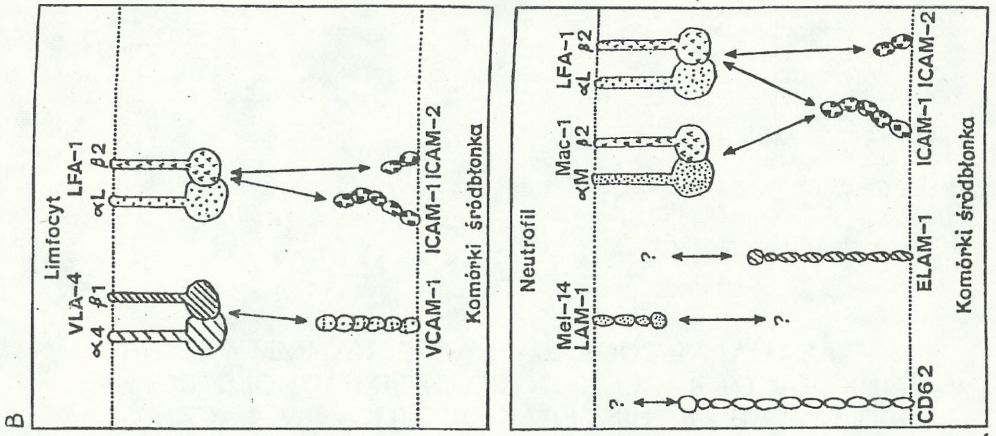
Zakład Immunologii

Instytutu Transplantologii Akademii Medycznej

Warszawa

AKTUALNE POGLĄDY NA MECHANIZMY WARUNKUJĄCE KRAŻENIE KOMÓREK IMMUNOLOGICZNIE AKTYWNYCH I ICH INTERAKCJE Z TKANKĄ ŁĄCZNĄ

Komórki zaangażowane w odpowiedź immunologiczną krążą pomiędzy krwią a układem chłonnym. W warunkach zdrowia ściana naczyniowa nie sprzyja przyleganiu tych komórek do śródbłonka naczyniowego, jednak w sytuacjach patologicznych mogą one przenikać przez tę ścianę i naciekać tkanki i narządy. Proces zapalny z jego mediatorami (endotoksyny, interleukina 1, czynnik martwicy nowotworów itd.) indukuje pojawienie się na komórkach śródbłonka ligandów, ułatwiających dotkankową wędrówkę komórek. Odbywa się to m.in. dzięki zdolności limfocytów i fagocytów do adhezji do śródbłonka naczyniowego, przenikania pomiędzy jego komórkami i przez błonę podstawną, a następnie interakcji z tkanką łączną, a ściślej z jej pozakomórkową macierzą (ECM, extracellular matrix), co jest schematycznie przedstawione na rys. 1, część lewa. Jak wspomniano, zjawisko przylegania leukocytów do śródbłonka zależy m.in. od ekspresji odpowiednich receptorów i ich ligandów na obu typach komórek. Jednym z nich jest LFA-1 (Leukocyte-Function-Antigen-1) obecny na leukocytach wielo- i jednojądrzastych, wiążący się z dwoma ligandami śródbłonka: ICAM-1 i ICAM-2, a – jak ostatnio wykazano – istnieje również ICAM-3 (Interstitial Cell Adhesion Molecule). W przeciwieństwie do LFA-1 (obecnego na leukocytach) ICAM-1 może być obecny na wielu komórkach, gdzie jego poziom wzrasta m.in. w czasie zachodzenia procesu zapalnego. W istocie mediatory zapalenia, takie jak endotoksyny bakteryjne, γ -interferon, interleukina-1 (IL-1) i czynnik martwicy nowotworów (TNF, Tumor Necrosis Factor) powodują znaczny wzrost syntezy ICAM-1, a przez to wzmożone przyleganie limfocytów i monocytów poprzez ich błonowy LFA-1. Uważa się, że wzrost syntezy ICAM-1 przez komórki śródbłonka warunkuje nacieki złożone z komórek jednojądrzastych, co obserwuje się w drugiej fazie procesu zapalnego (w przeciwieństwie do fazy wczesnej, w której przeważają granulocyty obojętnochłonne). W przeciwieństwie do ICAM-1, ICAM-2 jest obecny na normalnym śródbłonku i zachowuje się bez zmian w odpowiedzi na bodziec zapalny.



Rys. 1. A – schemat przechodzenia leukocytów z krwi do tkanki łącznej. B – interakcje adhezywne limfocytów z komórkami śródbłonna zależą m.in. od wiązania VLA-4 z VCAM-1 oraz LFA-1 z ICAM-1 i ICAM-2 (a prawdopodobnie i ICAM-3). C – neutrofile przylegają do śródbłonna za pośrednictwem swych receptorów Mac-1 i LFA-1, reagujących z ICAM. LAM (LECAM) wiąże się z innym ligandem śródbłonkowym, z kolei ligandy śródbłonkowe CD62 (PADGEM) i ELAM-1 umożliwiają adhezję neutrofilii za pośrednictwem ich niezbyt dobrze jeszcze sprecyzowanych receptorów

LFA-1 należy do białek określanych nazwą integryn i zbudowanych z łańcuchów α i β . Na podstawie zróżnicowania strukturalnego łańcuchów β wyróżnia się trzy zasadnicze grupy integryn: β_1 , β_2 i β_3 . LFA-1 jest przedstawicielem grupy β_2 , do której należy także Mac-1 i p150,95, które są obecne na leukocytach. Te dwie ostatnie integryny odpowiadają za adhezję monocytów i granulocytów do innych komórek i składników dopełniacza. Z kolei grupa integryn, obecna m.in. na monocytach, płytkach krwi i śródbłonku, warunkuje adhezję do takich ligandów białkowych jak fibrynogen, witronektyna i fibronektyna (obecna w wysokim stężeniu w surowicy krwi i samej ECM).

Adhezja do śródbłonka jest również uwarunkowana przez nie-integrynowe białka zaliczane do grupy tzw. selektyn, m.in. LECAM-1 (Leu-8), odpowiedzialny za recyrkulację limfocytów między krwią a układem chłonnym, a także za przyleganie neutrofilii do zapalnie zmienionego śródbłonka za pośrednictwem nie do końca zdefiniowanego ligandu. Nieco później po zadziałaniu bodźca zapalnego (2–8 godz.) na śródbłonku pojawia się natomiast ELAM-1 (Endothelial – Leukocyte Adhesion Molecule), warunkujący wzmożoną adhezję neutrofilii we wczesnej fazie zapalenia (rys. 1, część prawa). Sądzi się, że różnice w kinetyce pojawiania się na śródbłonku ELAM-1 i ICAM-1, a także niedawno opisanego VCAM-1 (Vascular – Cell Adhesion Molecule) (w pierwszych godzinach po zadziałaniu bodźca zapalnego ELAM, a potem ICAM-1 oraz VCAM-1) warunkują pierwotny napływ do ogniska zapalnego granulocytów obojętnochłonnych (neutrofile), a następnie komórek jednojądrzastych (monocyty i limfocyty).

Kolejną, niedawno opisaną selektyną, jest PADGEM, białko pojawiające się stosunkowo szybko po zadziałaniu bodźca zapalnego i które, według najnowszych badań, ma być współodpowiedzialne za zjawisko tzw. toczenia się (rolling) leukocytów. W myśl tej hipotezy PADGEM przyczynia się do zmiany szybkiego wewnątrznaczyniowego ruchu leukocytów z prądem krwi na ich powolne „toczenie się” przy ścianie naczyniowej, a następnie zależne od interakcji LFA-1: ICAM przyleganie do śródbłonka z następowym przenikaniem pomiędzy jego komórkami, za co odpowiada m.in. ICAM i VCAM. Jak wynika z powyższego, proces adhezji leukocytów do śródbłonka zależy od interakcji co najmniej kilku receptorów z ich odpowiednimi ligandami, które – pojawiając się w różnym czasie od zadziałania inicjującego je bodźca – wpływają w znaczący sposób na skład komórek przechodzących przez śródbłonek do tkanki łącznej pośródbłonkowej.

Po przejściu przez śródbłonek limfocyty i fagocyty napotykać na swej drodze ECM. Stosunkowo najlepiej poznaną i odgrywającą szczególną rolę w interakcjach limfocytów z ECM jest grupa β_1 integryn, określana także terminem VLA (Very Late Antigen, tzn. pojawiająca się późno po pobudzeniu komórki – nawet po tygodniach). Wspólny łańcuch β może się tu łączyć z co najmniej 6 łańcuchami α , tworząc odpowiednie integryny VLA-1 do VLA-6. Ligandy tkanki łącznej dla integryn VLA-1 (α_1 : β_1) i VLA-2 (α_2 : β_1) nie są

dokładnie zdefiniowane, przypuszcza się, że są nimi kolagen i laminina, znajdująca się w błonie podstawnej (rys. 2). Dla VLA-3 ($\alpha_3:\beta_1$) ustalono kolagen jako docelowy składnik ECM, lecz nie wyklucza się możliwości wiązania przez ten receptor również fibronektyny i lamininy (rys. 2).



Rys. 2. Po przeniknięciu przez białka błony podstawnej (kolagen typ IV i laminina) limfocyty i fagocyty wnikają w macierz tkanki łącznej, gdzie dochodzi do ich interakcji z kolagenem typ I i fibronektyną, białkami produkowanymi m.in. przez fibroblasty

Najciekawszym receptorem integrynowym dla ECM jest VLA-4 ($\alpha_4:\beta_1$), rozpoznająca tzw. fragment CS-1 fibronektyny. Ten sam receptor (aczkolwiek część odmienna od wiążącej FN) łączy się także z VCAM-1 pojawiającym się na zmienionym zapalnie śródbłonku. Jak wynika z powyższego, VLA-4 może potencjalnie odgrywać dużą rolę w patofizjologii krążenia limfocytów, będąc odpowiedzialna za ich przyleganie zarówno do warstwy fibronektyny na śródbłonku, jak i do samych komórek śródbłonka poprzez indukowany na nich VCAM-1. VLA-5 ($\alpha_5:\beta_1$) łączy się natomiast z fibronektyną poprzez fragment zawierający trójpeptyd arginina-glicyna-asparagina (RGD). Limfocyty T człowieka, komórki NK (tzw. naturalne killery, odpowiadające m.in. za niszczenie komórek nowotworowych) i limfocyty B wiążą się z fibronektyną. Limfocyty B (w odróżnieniu od pierwszych komórek) łączą się z fibronektyną wyłącznie za pośrednictwem VLA-4, natomiast limfocyty T wykorzystują do tego celu przede wszystkim VLA-5, VLA-6 wiąże się z lamininą.

Zgodnie z powyższymi danymi, limfocyty T wykazują obecność nieznacznych ilości VLA-3 i sporych VLA-4, 5 i 6, zaś po pobudzeniu wzrasta w nich VLA-3, 4 i 5, spada VLA-6 i pojawia się VLA-1 i VLA-2. Limfocyty B są słabo VLA-2 i VLA-3+, mają natomiast duże ilości VLA-4. Monocyty wykorzystują VLA-5 do adhezji do fibronektyny. Neutrofile nie mają powierzchniowych VLA, natomiast eozynofile i bazofile są VLA-4+.

Wymienione wyżej interakcje pomiędzy integrzynami limfocytarnymi a ich odpowiednikami w obrębie ECM wzbudzają ostatnio szczególne zainteresowanie. Jak wynika z dotychczasowych rozważań, limfocyty i monocyty w drodze do miejsca zadziałania antygeny przechodzą przez śródbłonek, a następnie wędrują przez ECM. Jak się wydaje, proces ten nie polega jedynie na biernej wędrówce, ponieważ na drodze swej komórki wchodzi w reakcje ze składnikami ECM, przede wszystkim za pośrednictwem swych receptorów integrzynowych. Wykazano, że np. interakcje limfocytów z fibronektyną i kolagenem mogą sprzyjać procesowi aktywacji limfocytów. Tak więc białka ECM nie są jedynie bierną masą, przez którą muszą się przecisnąć limfocyty i fagocyty na drodze swej wędrówki, lecz stanowią aktywne dla nich ligandy, regulujące nie tylko ich ruchliwość, ale i aktywność immunologiczną. Co więcej, ostatnio stwierdzono, że również molekuly obecne na śródbłonku (ICAM i VCAM, nie zaś ELAM) mogą wywierać działanie aktywujące limfocyty oprócz uprzednio opisanego, znanego działania adhezyjnego w stosunku do tych komórek.

Ostatnio podkreśla się rolę nie-integrzynowych struktur mogących regulować adhezję limfocytów do ECM. Tak więc molekula CD26 może wiązać się z kolagenem. Jest to białko odpowiadające enzymowi błonowemu peptydazie IV, której ekspresja wzrasta po aktywacji komórek. Z kolei CD73 jest identyczny z enzymem 5-nukleotydazą, mogącym wiązać fibronektynę i lamininę.

Dokładniejsze badania wykazują, że sama ekspresja danej integryny nie jest równoznaczna z jej funkcją. Tak więc niepobudzone limfocyty T słabo przylegają do fibronektyny i lamininy pomimo wspomnianej już ekspresji odpowiednich ligandów, natomiast adhezja ta wzrasta gwałtownie już w kilka minut po pobudzeniu komórek. Nie towarzyszy temu wzrost ekspresji odpowiednich integrzyn, zatem chodzi tu o indukcję zmian jakościowych w cząsteczce integryny, nie zaś ilościowych. To samo zjawisko zostało opisane dla LFA-1: ICAM-1, a także CD44: hialuronian, gdzie nawet wysoka ekspresja CD44 nie oznacza wysokiego powinowactwa do tego ostatniego ligandu, będącego mukopolisacharydem tkanki łącznej. Wykazano również istnienie znaczących różnic w ekspresji integrzyn przez poszczególne subpopulacje limfocytów, co odnosi się przede wszystkim do limfocytów „naiwnych” (które nie zetknęły się dotychczas z antygenami) i limfocytów „pamięci” (będących po kontakcie z antygenem), odpowiednio posiadających antygeny oznaczane CD45RO i CD45RA. Wykazano m.in., że komórki pamięci wykazują zdolność do lokalizacji w miejscach zadziałania antygeny, stąd ich lokalizacja w narządach objętych procesami autoimmunizacyjnymi, przeszczepach itd. Komórki te wykazują 2–4 razy wyższą ekspresję integrzyn LFA-1, VLA-4 i VLA-6 oraz ich wspólnego łańcucha β_1 (CD29).

Jak wynika z powyższego, interakcje limfocytów z ECM mogą odgrywać istotną rolę w regulacji ich funkcji. Fakt, że komórki te wykazują obecność integrzynowych i nie-integrzynowych receptorów dla ECM sugeruje, że

interakcje ze składnikami ECM mogą wpływać na migrację tych komórek. Wiadomo, że kolagen i fibronektyna mogą wywierać wpływ na ruchliwość komórek *in vitro*, a zapewne i *in vivo*. Można założyć, że adhezywne reakcje limfocytów z kolagenem IV i lamininą (składniki błony podstawnej) mogą odgrywać zatem rolę w procesie przechodzenia limfocytów i fagocytów przez te błony. Z kolei przyleganie do kolagenu i fibronektyny może warunkować czasowe unieruchomienie komórek immunologicznie kompetentnych w miejscu zachodzenia reakcji immunologicznej. Podobnie, ECM obecna na powierzchni komórek śródbłonna może wpływać na interakcje komórkowe z leukocytami, np. CD44 może ułatwiać przyleganie do śródbłonna przez adhezję do pokrywającego go hialuronianu. Podobnie, fibronektyna związana z błoną komórkową może prawdopodobnie wpływać na adhezję limfocytów do śródbłonna. Istnieją również dane do przypuszczeń, że białka ECM mogą odgrywać rolę w procesie różnicowania limfocytów, np. wspomniana interakcja CD44: hialuronian może mieć znaczenie w procesach krwiotwórczych i w różnicowaniu limfocytów T w grasicy. Kolagen może również nasilać reakcję mieszanej hodowli limfocytów, będącą *in vitro* modelem odporności transplantacyjnej.

Jak zatem już wspomniano, tkanka łączna nie jest jedynie bierną substancją, przez którą limfocyty i fagocyty odbywają wędrówkę pomiędzy krwią, chłonką i tkankami, ale wywiera regulujący wpływ na ich funkcje. Można się spodziewać, że dalsze poznanie charakteru interakcji limfocyty : ECM przyczyni się do opracowania nowych, skuteczniejszych schematów leczenia chorób o podłożu immunologicznym.

ANDRZEJ GÓRSKI

CURRENT VIEWS ON THE MECHANISMS REGULATING THE CIRCULATION OF IMMUNOCOMPETENT CELLS AND THEIR INTERACTIONS WITH THE CONNECTIVE TISSUE

S u m m a r y

The infiltration of lymphocytes into tissue is an essential component of many immunologic reactions. There has been rapid progress toward our understanding of the initial step in the extravasation and migration of lymphocytes through the extracellular matrix (ECM). Lymphocyte motility in ECM is a property with potentially great impact on the treatment of autoimmune disease and neoplasia. Such lymphocyte: ECM interactions are mediated by integrin and non-integrin receptors on those cells and can be blocked by specific monoclonal antibodies. Likewise, lymphocytes and monocytes possess receptors for molecules present on resting and activated endothelium (ICAM, VCAM, selectins) which enable them to roll on, adhere to and transmigrate through the endothelial layer. Again, specific monoclonals are available that interfere with that process. Recent data indicate that those antibodies can provide a novel and efficient means of preventing and treating experimentally induced autoimmune diseases and graft rejection.

LITERATURA

1. Hynes R. O. — *Integrins: versality, modulation, and signalling in cell adhesion*. Cell 69, 11, 1992.
2. Patarroyo M., Prieto J., Rincón J. i wsp. — *Leukocyte-cell adhesion: a molecular process fundamental in leukocyte physiology*. Immunol. Reviews 114, 67, 1990.
3. Shimizu Y., Shaw S. — *Lymphocyte interactions with extracellular matrix*. FASEB J. 5, 2292, 1991
4. Springer T. A. — *Adhesion receptors of the immune system*. Nature 346, 425, 1990.