

Received: 2007.06.05  
Accepted: 2007.10.30  
Published: 2007.11.19

## Hialuronian jako czynnik regulujący proces zapalenia\*

### Hyaluronan-mediated regulation of inflammation

Rafał Krasieński<sup>1</sup>, Henryk Tchórzewski<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Zakład Patofizjologii i Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

<sup>2</sup> Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi

#### Streszczenie

Hialuronian jest biopolimerem o dużej masie cząsteczkowej, którego liniowa struktura jest utworzona przez powtarzające się podjednostki dwucukrowe. W skład pojedynczej podjednostki wchodzi: N-acetylo-D-glukozamina i kwas D-glukuronowy. Glikozamikan ten jest głównym składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej. Hialuronian poza rolą strukturalną może wpływać na proliferację, różnicowanie i migrację komórek, angiogenezę oraz reakcje zapalne i czynność komórek odpornościowych. W przebiegu zapalenia następuje nasilenie dynamiki przemian hialuronianu. Pod wpływem enzymów i wolnych rodników tlenowych obecnych w ognisku zapalnym postać wielkocząsteczkowa jest degradowana do fragmentów o mniejszej masie cząsteczkowej, wykazujących wiele odmiennych w stosunku do cząstki natywnej funkcji. Liczne dane literaturowe wskazują, że działanie hialuronianu na komórki odpornościowe jest ściśle zależne od jego masy cząsteczkowej. Postać wielkocząsteczkowa może uczestniczyć w wygaszaniu reakcji zapalnych, zaś fragmenty o małej masie cząsteczkowej działają prozapalnie i aktywują na komórki układu immunologicznego. Takie fragmenty, poprzez oddziaływanie z receptorami powierzchniowymi (np. CD44, RHAMM, TLR4), aktywują komórki odpornościowe, wpływają na wytwarzanie cytokin, chemokin, reaktywnych form tlenu i innych czynników zaangażowanych w proces zapalenia. Hialuronian może się więc okazać istotnym czynnikiem regulującym zapalenie. Fragmenty o małej masie cząsteczkowej generowane już we wczesnej fazie procesu zapalnego dostarczają sygnału o uszkodzeniu tkanki i mobilizują komórki immunokompetentne, a postać wielkocząsteczkowa poprzez hamowanie czynności komórek odpornościowych zapobiega nadmiernemu nasileniu reakcji zapalnych.

#### Słowa kluczowe:

**hialuronian • hialuronian niskocząsteczkowy • hialuronian wielkocząsteczkowy • zapalenie**

#### Summary

Hyaluronan is high-molecular-weight biopolymer. Its linear structure is created by repeating disaccharide units. A single unit is composed of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucuronic acid. Hyaluronan is the main component of the extracellular matrix. Apart from its structural role, hyaluronan can influence cell proliferation, differentiation, and migration, angiogenesis, as well as inflammation and immune cell function. During inflammation, high-molecular-weight hyaluronan is broken down under the influence of free radicals and enzymes to smaller fragments. Numerous literature data show that the effect of hyaluronan on immune cells is closely dependent on its molecular mass. High-molecular-weight hyaluronan can participate in restraining inflammation, while the low-molecular-weight form possesses a proinflammatory effect and activates immune cells. Through interaction with surface receptors (CD44, RHAMM, TLR4), hyaluronan fragments stimulate immune cells and enhance cytokine and reactive oxygen species production

\* Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2007-2009, grant promotorski Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

as well as other factors participating in inflammation. Hyaluronate can thus be an important regulator of the inflammatory process. Low-molecular-weight fragments deliver signal about tissue damage and mobilize immune cells, while the high-molecular-form suppresses immune cell function and prevents excessive exacerbation of inflammation.

**Key words:** hyaluronan • high-molecular-weight hyaluronan • low-molecular-weight hyaluronan • inflammation

**Full-text PDF:** [http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_61/11508.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/11508.pdf)

**Word count:** 2439

**Tables:** 1

**Figures:** 1

**References:** 52

**Adres autora:** mgr Rafał Krasieński, Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź; e-mail: rafal.krasinski@poczta.onet.pl

**Wykaz skrótów:** **HA** – hialuronian; **HAS** – syntaza hialuronianowa; **HMWH** – hialuronian wielkocząsteczkowy; **LMWH** – hialuronian niskocząsteczkowy; **PMNL** – leukocyty wielojądrowe; **TLR** – receptor toll-podobny (toll-like receptor).

## WSTĘP

Hialuronian (HA) – glikozaminoglikan będący głównym składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej – jest biopolimerem o liniowej, nierozgałęzionej cząsteczce, zbudowanym z powtarzających się podjednostek dwucukrowych. W skład pojedynczej podjednostki wchodzi: N-acetylo-D-glukozamina i kwas D-glukuronowy [20]. W odróżnieniu od innych glikozaminoglikanów (siarczan heparyny, siarczan chondroityny, siarczan dermatanu) jest syntetyzowany nie we wnętrzu komórki a na wewnętrznej powierzchni błony komórkowej [33] z udziałem enzymów – syntaz hialuronianowych HAS1, HAS2, HAS3 [50], a powstająca *de novo* cząsteczka ulega translokacji do przestrzeni zewnątrzkomórkowej w miarę wydłużania łańcucha [33]. HA występuje fizjologicznie jako polimer o dużej masie cząsteczkowej ( $>10^6$  Da).

Początkowo HA uważano jedynie za element strukturalny i stabilizujący tkanki. Wypełnia on przestrzenie między komórkami, dzięki zdolności wiązania dużych ilości wody zapewnia prawidłową hydratację tkanek, w stawach pełni funkcję smaru zmniejszając siły tarcia. W odróżnieniu od typowych elementów strukturalnych, przemiany HA charakteryzują się jednak dużą dynamiką – jego okres półtrwania w skórze to około 12 godzin [20]. Procesy syntezy i degradacji tego glikozaminoglikanu przebiegają szczególnie intensywnie w miejscu toczącego się procesu zapalnego [30]. Tempo przemian HA oraz istnienie receptorów, poprzez które może on wpływać na czynność komórek (m.in. CD44, RHAMM, TLR4) wskazuje, że jego rola jest zdecydowanie bardziej złożona niż tylko zapewnienie prawidłowych właściwości fizycznych tkanek. Przez oddziaływanie z receptorami, HA może wpływać na takie procesy jak proliferacja, różnicowanie i dojrzewanie komórek, migracja komórek w obrębie tkanek, angiogeneza czy ekspresja genów wielu cytokin i chemokin.

Istotną rolę przypisuje się hialuronianowi w procesie nowotworzenia. Wiele typów nowotworów, np. rak jelita grube-

go, rak jajnika, wytwarza zwiększone ilości HA. Wykazano, że HA sprzyja proliferacji komórek nowotworowych i rozwojowi guza [14], a także może tworzyć fizyczną barierę chroniącą guz przed wpływem układu odpornościowego [46] i wpływać na czynność komórek odpornościowych [18]. Pewne nowotwory, jak np. rak pęcherza moczowego czy rak prostaty, wytwarzają hialuronidazę degradującą HA [21]. Powstające oligosacharydy HA sprzyjają rozwojowi nowotworu poprzez stymulację angiogenezy [39] i nasilenie migracji komórek nowotworowych [40].

Liczne dane literaturowe wskazują również, że HA poprzez swój wpływ na komórki układu immunologicznego może regulować reakcje zapalne i przebieg odpowiedzi immunologicznej.

## HIALURONIAN A ZAPALENIE

Reakcje zapalne uruchamiane w odpowiedzi na zakażenie czy uszkodzenie tkanek mają na celu ograniczenie działania i eliminację czynników szkodliwych, pobudzenie procesów naprawczych i przywrócenie prawidłowej funkcji narządu. Wiele oddziaływań między poszczególnymi elementami układu immunologicznego pozwala na precyzyjną regulację procesu zapalnego. Hialuronian – główny składnik macierzy zewnątrzkomórkowej – poprzez swój wpływ na komórki odczynu zapalnego może stanowić ważny element regulujący zapalenie.

W przebiegu zapalenia następuje nasilenie dynamiki przemian hialuronianu [30]. Zwiększa się jego synteza oraz degradacja, w ognisku zapalnym gromadzą się fragmenty o mniejszej masie cząsteczkowej zdolne do aktywacji wewnątrzkomórkowych ścieżek transdukcji sygnału. Ich powstawanie jest wynikiem działania enzymów (zwłaszcza hialuronidaz) [10], reaktywnych form tlenu i peroksynitratów [26], a także mechanicznego niszczenia postaci wielkocząsteczkowej [23]. Wiele danych literaturowych wskazuje, że biologiczne

Tabela 1. Przykłady różnego wpływu hialuronianu wielkocząsteczkowego (HMWH) i niskocząsteczkowego (LMWH) na komórki odpornościowe. W nawiasach podano źródło literaturowe

| Komórka                  | LMWH   |  | HMWH              |   |
|--------------------------|--|--|-------------------|---|
|                          | Masa cząsteczkowa                            | Efekt  | Masa cząsteczkowa | Efekt   |
| Komórki dendrytyczne     | 4–14 oligosacharydów [44,45]<br>135 kDa [46] | stymulacja wytwarzania cytokin zapalnych i indukcja dojrzewania komórek dendrytycznych | >200 kDa [44,45]  | brak wpływu na wytwarzanie cytokin zapalnych i ekspresję HLA-DR, B7-1, B7-2 |
| Makrofagi                | <500 kDa [25]                                | indukcja ekspresji genów cytokin i chemokin  | >1000 kDa [25]    | brak wpływu na syntezę mRNA dla chemokin                                    |
| Makrofagi                | 200 kDa [24]                                 | indukcja ekspresji genu iNOS   | 6000 kDa [24]     | brak wpływu na ekspresję genu iNOS  |
| Makrofagi                | <500 kDa [29]                                | aktywacja NF-κB  | >1200 kDa [29]    | hamowanie aktywacji NF-κB pod wpływem czynnika zapalnego                    |
| Eozynofile               | 200 kDa [31]                                 | znaczne wydłużenie czasu przeżycia eozynofili, stymulacja wytwarzania TGF-β            | >3000 kDa [31]    | mniejszy wpływ na czas przeżycia eozynofili                                 |
| Makrofagi                | <90 kDa [9]                                  | stymulacja fagocytozy  | >500 kDa [9]      | zahamowanie fagocytozy  |
| Limfocyty T regulatorowe | 3 kDa [1]                                    | brak wpływu na właściwości supresorowe Treg  | 1500 kDa [1]      | nasilenie właściwości supresorowych Treg                                    |

oddziaływania hialuronianu na komórki odpornościowe są uzależnione od jego masy cząsteczkowej. Postać wielkocząsteczkowa działa immunosupresyjnie i przeciwzapalnie, zaś fragmenty o mniejszej masie cząsteczkowej zwiększają napływ leukocytów do ogniska zapalenia i indukują ekspresję wielu genów czynników prozapalnych (tabela 1). Produkty degradacji hialuronianu mogą, poprzez oddziaływanie z receptorami powierzchniowymi, dostarczać informacji o uszkodzeniu tkanki, stanowić „sygnał niebezpieczeństwa” [34] mobilizujący układ immunologiczny i stymulujący komórki do wywierania właściwych działań biologicznych.

### RECEPTORY HIALURONIANU

Głównym receptorem hialuronianu, poprzez który wywiera on swoje działania, jest cząstka CD44. Glikoproteina ta jest szeroko rozpowszechniona na komórkach układu immunologicznego i ma kilkanaście izoform powstających w procesie alternatywnego splicingu [38], charakteryzujących się różnym powinowactwem do hialuronianu. Interakcje CD44 – HA odgrywają rolę w takich procesach, jak adhezja leukocytów do śródbłonna naczyniowego, ich migracja do tkanek i zasiedlanie ogniska zapalnego [3,16], a poprzez indukcję ekspresji wielu genów czynników prozapalnych wpływają na czynność komórek odpornościowych, m.in. cytotoxyczność PMNL i komórek NK [32,37]. Receptor CD44 jest zaangażowany również w internalizację oligosacharydów hialuronianu do wnętrza komórek. Wykazano [43], że u myszy z usuniętym receptorem CD44 (knock-out), u których wywołano doświadczalne zapalenie płuc indukowane bleomycyną, dochodziło do akumulacji hialuronianu w tkance płucnej, stałego napływu komórek odpornościowych (PMNL, makrofagi, limfocyty), zaburzenia procesu ich apoptozy, a w konsekwencji do niekontrolowanego i nadmiernego na-

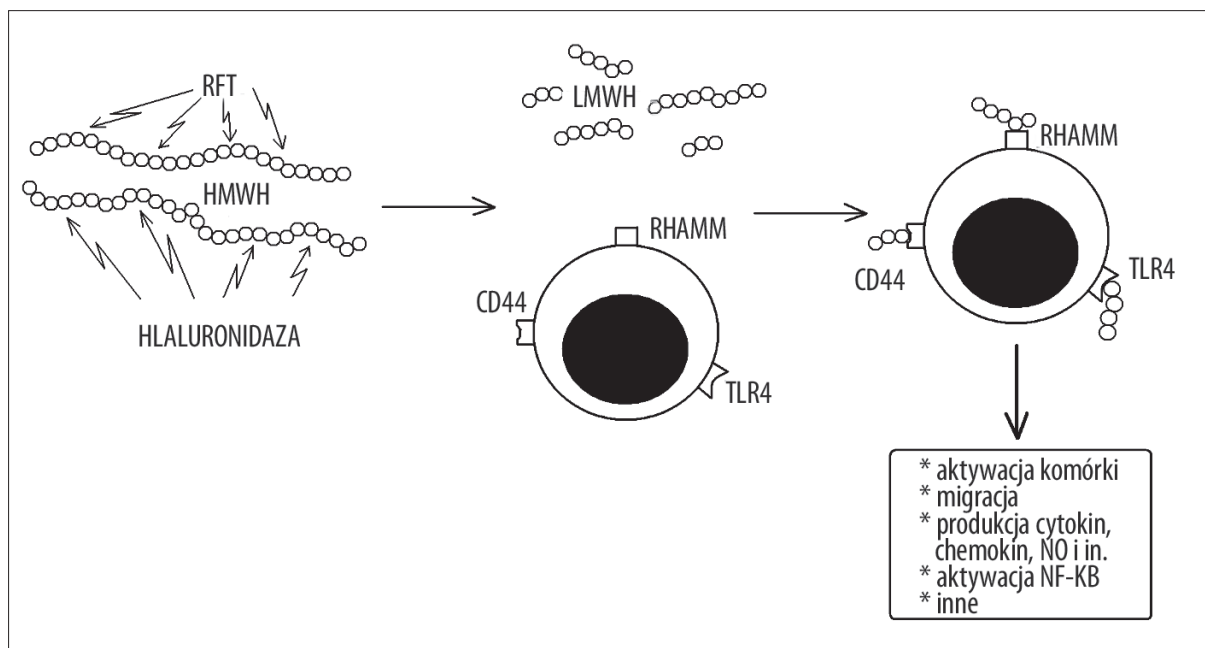
silenia reakcji zapalnych prowadzącego do śmierci zwierzęcia. U myszy typu dzikiego obserwowano stopniowy spadek poziomu LMWH i ograniczenie procesu zapalnego.

Innym receptorem, poprzez który oddziałuje hialuronian jest RHAMM (receptor for hyaluronan mediated motility). Występuje on zarówno na powierzchni komórki jak i wewnątrzkomórkowo, i podobnie jak w przypadku CD44 ma swoje warianty wytwarzane w procesie alternatywnego splicingu. Poprzez interakcje z cytoszkieletem, RHAMM jest zaangażowany w procesy migracji komórek i ich proliferację, a także odgrywa istotną rolę w gojeniu się ran. Zaman i wsp. [52] wykazali jego rolę w procesie chemotaksji i migracji makrofagów wywołanej przez hialuronian. U myszy z usuniętym genem receptora CD44, RHAMM może przejmować część funkcji tej glikoproteiny [28].

Fragmenty hialuronianu o małej masie cząsteczkowej oddziałują także z receptorami TLR – głównymi receptorami odporności naturalnej [34,42,44]. Wykazano, że receptory TLR4, których głównym ligandem jest LPS, mogą być również pobudzane przez hialuronian niskocząsteczkowy. Takie oddziaływanie ma istotne znaczenie w procesie aktywacji komórek dendrytycznych i wytwarzaniu przez nie cytokin prozapalnych [44]. Komórki śródbłonna naczyń krwionośnych mikrokrążenia również rozpoznają LMWH poprzez receptory TLR4 i w odpowiedzi uwalniają m.in. IL-8 – ważny czynnik chemotaktyczny neutrofilów [42].

### HIALURONIAN WIELKOCZĄSTECZKOWY W ZAPALENIU

Dane literaturowe wskazują, że hialuronian wielkocząsteczkowy (HMWH) – fizjologiczny składnik macierzy zewnątrzkomórkowej – działa przeciwzapalnie i immunosupre-



Ryc. 1. Oddziaływanie hialuronianu niskocząsteczkowego na komórki odpornościowe. Depolimeryzacja wielkocząsteczkowego hialuronianu (HMWH) zachodząca pod wpływem reaktywnych form tlenu (RFT) i enzymów, m.in. hialuronidaz, prowadzi do powstania fragmentów o małej masie cząsteczkowej (LMWH). LMWH oddziałując poprzez receptory (m.in. CD44, RHAMM, TLR4) wywołuje wiele efektów biologicznych

syjnie. Wykazano, że hamuje on właściwości fagocytarne makrofagów i PMNL [9,41]. Stopień zahamowania zwiększa się wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej HA, zaś fragmenty o małej masie cząsteczkowej (~90 kDa) nie tylko nie działają hamująco, ale nasilają fagocytozę [9].

Działanie przeciwzapalne HMWH uwidocznia się także w jego wpływie na jądrowy czynnik transkrypcyjny NF-κB. Aktywacja NF-κB prowadzi do transkrypcji wielu genów, m.in. cytokin prozapalnych (IL-1, IL-6, TNF-α), chemokin (IL-8), molekuł adhezyjnych, indukowanej syntazy tlenu azotu (iNOS) i in. Zaobserwowano, że preinkubacja makrofagów z HMWH powoduje zahamowanie aktywacji NF-κB pod wpływem czynnika prozapalnego [29]. Zdolność ta maleje wraz ze spadkiem masy cząsteczkowej HA, a fragmenty o masie <500 kDa same aktywują NF-κB [29]. Opisano hamujący wpływ HMWH (Healon, m.c. 4×10<sup>6</sup> Da) na wytwarzanie cytokin prozapalnych (IL-1β, IL-6) przez makrofagi; dodatkowo stwierdzono zahamowanie proliferacji tych komórek [35]. Zahamowanie wytwarzania cytokin stwierdzono także w odniesieniu do fibroblastów [48]. Hialuronian o masie cząsteczkowej 600–800 kDa osłabiał ekspresję genów IL-8 i iNOS w niestymulowanych fibroblastach. Stymulacja fibroblastów przez IL-1 powodowała m.in. wzrost ekspresji genu TNF-α, a hialuronian znosił to działanie. Nie zostało natomiast stwierdzone, czy zahamowanie wytwarzania cytokin jest w powyższych przypadkach związane z osłabieniem aktywacji NF-κB.

Istotną rolę w wygaszaniu procesu zapalnego odgrywają limfocyty T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Treg). Hamują one proliferację innych typów komórek i wytwarzanie przez nie cytokin, a także są pomocne w utrzymaniu tolerancji wobec autoantygenów. Na spoczynkowych limfocytach Treg występuje wariant receptorów CD44 o niskim powinowactwie do

HA [1,7]. Zmiany konformacyjne tych receptorów wywołane aktywacją komórki wielokrotnie zwiększają ich zdolność do wiązania HA. Wykazano, że HMWH nasila supresorowe właściwości Treg *in vitro*, co przejawia się m.in. znaczącym zahamowaniem proliferacji komórek efektorowych dla limfocytów T regulatorowych [1,7].

HA obecny w miejscu toczącego się procesu zapalnego może tworzyć charakterystyczne struktury, złożone z połączonych ze sobą pojedynczych łańcuchów tego glikozanoglikanu [2,4,12,22]. Rolę łączników pełnią takie cząstki, jak m.in. TSG-6 (TNF-stimulated gene 6), PTX3 (pentraksyna 3), TSP-1, IαI (inter-α-inhibitor), których ekspresja zachodzi pod wpływem mediatorów zapalenia. Uważa się, że takie struktury hialuronianu są wytwarzane we wnętrzu komórki, a w ich wytwarzaniu uczestniczy retikulum endoplazmatyczne [2,12]. Taka postać HA może ograniczać reakcje immunologiczne poprzez wiązanie monocytów, limfocytów T i B i utrzymywanie ich w stanie nieaktywnym i niewrażliwym na aktywację [2]. Występowanie takich struktur HA wykazano m.in. w chorobie Crohna i reumatoidalnym zapaleniu stawów [2,4,12].

Kwestią wciąż nie do końca wyjaśnioną jest, w jakim stopniu przeciwzapalne działanie HMWH wynika z indukcji wewnątrzkomórkowych szlaków transdukcji sygnału, a w jakim, ze względu na rozmiar cząsteczki i przyjmowaną konformację przestrzenną, z fizycznego blokowania dostępu czynników prozapalnych do receptorów komórkowych.

#### PROZAPALNE DZIAŁANIE HIALURONIANU NISKOCZĄSTECZKOWEGO

W miejscu procesu zapalnego zachodzi intensywne synteza HA i wzmożona jego degradacja pod wpływem uwalnianych z komórek enzymów (zwłaszcza hialuronidaz) i wol-

nych rodników tlenowych. Rozerwanie liniowej struktury HMWH skutkuje powstaniem fragmentów o mniejszej masie cząsteczkowej (LMWH), mogących aktywować komórki odpornościowe (komórki dendrytyczne, monocytu/makrofagi, PMNL), indukować ekspresję wielu genów i nasilać reakcje zapalne. LMWH wpływa na adhezję leukocytów do śródbłonna i ich migrację do ogniska zapalnego, aktywuje jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B, indukuje wytwarzanie wielu cytokin (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  i in.), chemokin (MCP-1 $\alpha$ , MCP-1 $\beta$ , RANTES, IL-8), metaloproteinaz macierzy (MMPs), czy tlenku azotu (NO) (ryc. 1).

### LMWH I MIGRACJA LEUKOCYTÓW

Migracja leukocytów ze światła naczynia krwionośnego do tkanki objętej procesem zapalnym wymaga w pierwszej kolejności zakotwiczenia komórek na powierzchni śródbłonna. Proces ten zachodzi z udziałem cząstek adhezyjnych: selektyn, integryn i cząstek z nadrodziny immunoglobulin. Czynniki występujące lokalnie w miejscu zapalenia, takie jak IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , LPS aktywują śródbłonek, wpływają na jego właściwości adhezyjne i stymulują wytwarzanie wielu czynników (IL-1, IL-8, PAF, MCP-1, tlenek azotu i in.) wspomagających migrację leukocytów.

Wykazano, że komórki śródbłonna mogą poprzez receptory TLR4 rozpoznawać fragmenty hialuronianu o małej masie cząsteczkowej gromadzące się lokalnie w miejscu zapalenia [42]. Po pobudzeniu receptorów TLR4 przez oligosacharydy hialuronianu, szczególnie intensywnie zwiększa się wytwarzanie IL-8 [42]. Cytokina ta jest ważnym czynnikiem chemotaktycznym dla neutrofilów – głównych komórek wczesnej fazy zapalenia. Poza działaniem chemotaktycznym stymuluje wybuch tlenowy oraz uwalnia czynniki i enzymy lizosomalne, które uczestniczą w eliminacji patogenu. Śródbłonek naczyniowy stanowi aktywny element odpowiedzi immunologicznej a produkty degradacji hialuronianu mogą dostarczać wczesnego sygnału o uszkodzeniu okolicznych tkanek i inicjować reakcje obronne.

### LMWH I CYTOKINY

Dane literaturowe wskazują, że fragmenty hialuronianu o masie cząsteczkowej 200–300 kDa mogą aktywować jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B [29] oraz stymulować wytwarzanie cytokin (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) [11,42] i chemokin (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES) [25] przez makrofagi, a także indukować syntazę tlenku azotu [21] i pobudzać wytwarzanie metaloelastazy [13]. Część wywieranych działań, takich jak m.in. stymulacja wytwarzania M-CSF, IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  zachodzi poprzez receptor CD44. Wpływ LMWH na wytwarzanie cytokin zaobserwowano również w przypadku eozynofili i neutrofilów. Stymulacja receptorów CD44 obecnych na ludzkich neutrofilach powoduje uwalnianie IL-6 [36]. Działanie LMWH na eozynofile objawia się m.in. wydzielaniem TGF- $\beta$  i zwiększeniem przeżywalności tych komórek [31].

Mniejsze fragmenty hialuronianu, złożone z 4–16 podjednostek disacharydowych (oligosacharydy hialuronianu) stymulują wytwarzanie cytokin przez komórki dendrytyczne [44,45]. Oddziaływanie to zachodzi głównie poprzez receptor TLR4. Ten typ receptorów jest zaangażowany także w oddziaływanie oligosacharydów hialuronianu na ko-

mórki śródbłonna naczyniowego, co przejawia się m.in. wzrostem wytwarzania IL-8 [42].

Poprzez swój wpływ na wytwarzanie cytokin i chemokin, hialuronian o małej masie cząsteczkowej może więc nasilać reakcje zapalne. Uwalniane lokalnie w miejscu zapalenia cytokiny pozwalają na precyzyjne sterowanie czynnością już obecnych komórek, regulują napływ innych populacji leukocytów i koordynują odpowiedź immunologiczną.

### LMWH I KOMÓRKI NK ORAZ LIMFOCYTY T $\gamma$ $\delta$

Komórki NK są ważnym elementem odpowiedzi immunologicznej wrodzonej. Pełnią funkcje efektorowe, a także wytwarzają cytokiny pro- i przeciwzapalne i w ten sposób regulują przebieg odpowiedzi immunologicznej. Wykazano, że pobudzenie receptorów CD44 obecnych na powierzchni komórek NK, których ligandem jest m.in. hialuronian, stymuluje sekrecję cytokin i hamuje apoptozę tych komórek, jak również wywołuje zmiany morfologiczne i wpływa na ekspresję markerów powierzchniowych [19].

Limfocyty T $\gamma$  $\delta$  występujące w skórze, nazywane także naskórkowymi dendrytycznymi limfocytami T (DETC), podobnie jak komórki NK mogą brać udział w reakcjach naturalnej cytotoxycywności. Mają zdolność rozpoznawania sekwenji peptydowych białek szoku cieplnego (HSP) stąd sugeruje się ich udział w tzw. odpowiedzi na stres. Rozpoznają własne antygeny pojawiające się na uszkodzonych keratynocytach i uczestniczą w procesie gojenia się ran. Wykazano, że czynnik wzrostu keratynocytów FGF-7 wytwarzany przez komórki DETC po ich aktywacji pobudza syntezę hialuronianu przez keratynocyty, i że generowany hialuronian odgrywa ważną rolę w procesie migracji makrofagów do miejsca zapalenia/zranienia. U myszy z usuniętym genem receptorów  $\gamma$  $\delta$ TCR obserwuje się zmniejszenie syntezy hialuronianu w obrębie rany i zakłócenie procesu migracji makrofagów [15].

### LMWH I KOMÓRKI DENDRYTYCZNE

Komórki dendrytyczne należą do komórek prezentujących antygen i są istotnym ogniwem układu immunologicznego, łącznikiem pomiędzy odpowiedzią immunologiczną naturalną i nabytą. Poprzez receptory TLR rozpoznają wysoce konserwatywne struktury patogenów charakteryzujące się odpowiednimi układami cukrów prostych. Aktywacja receptorów TLR indukuje dojrzewanie komórek dendrytycznych przejawiające się zwiększeniem ekspresji takich molekuł jak HLA-DR czy cząstek kostymulujących B7.1 i B7.2 i nasileniem wytwarzania cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12). Aktywowane komórki dendrytyczne migrują do okolicznych węzłów chłonnych, gdzie prezentują antygen naiwnym limfocytom T.

Termeer i wsp. [44,45], wykazali, że oligosacharydy hialuronianu obecne w miejscu zapalenia mogą aktywować komórki dendrytyczne i stymulować je do wytwarzania cytokin oraz pobudzać wytwarzanie metaloproteinaz [5], degradujących macierz zewnątrzkomórkową i ułatwiających ich migrację do lokalnych węzłów chłonnych. Proces aktywacji komórek dendrytycznych przez hialuronian zachodzi głównie poprzez receptory TLR4. Właściwości aktywujące mają oligosacharydy hialuronianu, nie zaś postać wiel-

kocząsteczkowa. Ich oddziaływanie na komórki dendrytyczne ujawnia się zwiększeniem ekspresji cząstek MHC II (HLA-DR) i molekuł kostymulujących B7.1 i B7.2, nasileniem wytwarzania cytokin prozapalnych (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12) [44,45,46], metaloproteinaz [5], a także wzrostem zdolności komórek dendrytycznych do stymulacji alogeicznych limfocytów T [27,46].

Istnieje hipoteza, że aktywacja limfocytów T przez komórki dendrytyczne i wpływ na ten proces oligosacharydów hialuronianu mogą odgrywać rolę w reakcjach odrzucania przeszczepu [46,51]. Fragmenty hialuronianu wytworzone w przeszczepionej tkance po jej reperfuzji aktywują komórki dendrytyczne dawcy lub biorecy, te zaś wytwarzają cytokiny prozapalne oraz w sposób antygenowo swoisty aktywują limfocyty T, co może być jedną z przyczyn uszkodzenia przeszczepionej tkanki [46].

Mummert i wsp. [27] udowodnili, że komórki dendrytyczne wykazują ekspresję zarówno pewnych izoform syntazy hialuronianowej, jak i hialuronidazy oraz że hialuronian występuje w postaci związanej z powierzchnią tych komórek. Taki hialuronian ułatwia interakcje między komórkami dendrytycznymi a limfocytami T i aktywację tych ostatnich.

## PODSUMOWANIE

Hialuronian – główny składnik macierzy zewnątrzkomórkowej – występuje w postaci liniowych, nierozgałęzionych cząsteczek. Uważany początkowo za element strukturalny, może wpływać na czynność komórek, w tym komórek układu odpornościowego. Decydujący wpływ na jego działanie ma masa cząsteczkowa. Pozostaje wciąż do wyjaśnienia mechanizm różnego oddziaływania na komórki postaci wielkocząsteczkowej i niskocząsteczkowej. Brak

jest danych literaturowych wskazujących czy hialuronian wielkocząsteczkowy aktywuje szlaki przekazywania sygnału. W przypadku postaci o małej masie cząsteczkowej redukcja sygnału może zachodzić m.in. z udziałem jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B oraz kinaz Ras [8]. Wykazano również, że zdolność komórek do odpowiedzi na fragmenty hialuronianu o różnej masie cząsteczkowej jest uzależniona od typu komórki. Hialuronian o masie cząsteczkowej 200–300 kDa aktywuje NF- $\kappa$ B i stymuluje wytwarzanie wielu cytokin i chemokin przez makrofagi [11,13,24,25,49], podczas gdy komórki dendrytyczne odpowiadają na fragmenty hialuronianu o znacznie mniejszej cząsteczce [15,27,44,45].

Pojawiają się doniesienia [6], że prozapalne działanie hialuronianu niskocząsteczkowego jest spowodowane obecnością zanieczyszczeń w stosowanych preparatach (LPS, DNA, białka). Stosowanie odpowiednich układów kontrolnych, takich jak np. polimiksyna B – silny inhibitor LPS, DNA-azy, proteinazy, a także wykorzystywanie preparatów o wysokim stopniu czystości i dokładnie scharakteryzowanych pod względem chemicznym wydają się przeczyć takim doniesieniom i wskazują na rzeczywisty udział produktów degradacji hialuronianu w indukcji reakcji zapalnych [34].

Hialuronian, któremu początkowo przypisywano jedynie rolę strukturalną, zdaje się więc być elementem regulującym odpowiedź immunologiczną. Postać wielkocząsteczkowa – fizjologiczny składnik macierzy zewnątrzkomórkowej – może współuczestniczyć w wygaszaniu reakcji zapalnych, a fragmenty o małej masie cząsteczkowej dzięki zdolności aktywacji komórek i indukcji ekspresji wielu genów mogą stanowić sygnał mobilizujący układ immunologiczny do działania, co pozwala na szybką i skuteczną eliminację patogenu.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Bollyky P.L., Lord J.D., Masewicz S.A., Evanko S.P., Buckner J.H., Wight T.N., Nepom G.T.: Cutting edge: high molecular weight hyaluronan promotes the suppressive effects of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2007; 179: 744–747
- [2] Day A.J., de la Motte C.A.: Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation? *Trends Immunol.*, 2005; 26: 637–643
- [3] DeGrendele H.C., Estess P., Siegelman M.H.: Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science*, 1997; 278: 672–675
- [4] de la Motte C.A., Hascall V.C., Drazba J., Bandyopadhyay S.K., Strong S.A.: Mononuclear leukocytes bind to specific hyaluronan structures on colon mucosal smooth muscle cells treated with polyinosinic acid: polycytidylic acid: inter-alpha-trypsin inhibitor is crucial to structure and function. *Am. J. Pathol.*, 2003; 163: 121–133
- [5] Fieber C., Baumann P., Vallon R., Termeer C., Simon J.C., Hofmann M., Angel P., Herrlich P., Sleeman J.P.: Hyaluronan-oligosaccharide-induced transcription of metalloproteinases. *J. Cell Sci.*, 2004; 117: 359–367
- [6] Filion M.C., Phillips N.C.: Pro-inflammatory activity of contaminating DNA in hyaluronic acid preparations. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2001; 53: 555–561
- [7] Firan M., Dhillon S., Estess P., Siegelman M.H.: Suppressor activity and potency among regulatory T cells is discriminated by functionally active CD44. *Blood*, 2006; 107: 619–627
- [8] Fitzgerald K.A., Bowie A.G., Skeffington B.S., O'Neill L.A.: Ras, protein kinase C zeta, and I kappa B kinases 1 and 2 are downstream effectors of CD44 during the activation of NF-kappa B by hyaluronic acid fragments in T-24 carcinoma cells. *J. Immunol.*, 2000; 164: 2053–2063
- [9] Forrester J.V., Balazs E.A.: Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate. *Immunology*, 1980; 40: 435–446
- [10] Frost G.I., Csoka T.B., Stern R.: The hyaluronidases: a chemical, biological and clinical overview. *Trends Glycosci. Glycotech.*, 1996; 8: 419–434
- [11] Gruber M.F., Webb D.S., Gerrard T.L.: Stimulation of human monocytes via CD45, CD44, and LFA-3 triggers macrophage-colony-stimulating factor production. Synergism with lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J. Immunol.*, 1992; 148: 1113–1118
- [12] Hascall V.C., Majors A.K., de la Motte C.A., Evanko S.P., Wang A., Drazba J.A., Strong S.A., Wight T.N.: Intracellular hyaluronan: a new frontier for inflammation? *Biochim. Biophys. Acta*, 2004; 1673: 3–12
- [13] Horton M.R., Shapiro S., Bao C., Lowenstein C.J., Noble P.W.: Induction and regulation of macrophage metalloelastase by hyaluronan fragments in mouse macrophages. *J. Immunol.*, 1999; 162: 4171–4176
- [14] Itano N., Atsumi F., Sawai T., Yamada Y., Miyaishi O., Senga T., Hamaguchi M., Kimata K.: Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 3609–3614
- [15] Jameson J.M., Cauvi G., Sharp L.L., Witherden D.A., Havran L.:  $\gamma$  T cell-induced hyaluronan production by epithelial cells regulates inflammation. *J. Exp. Med.*, 2005; 201: 1269–1279
- [16] Khan A.I., Kerfoot S.M., Heit B., Liu L., Andonegui G., Ruffel B., Johnson P., Kuberski P.: Role of CD44 and hyaluronan in neutrophil recruitment. *J. Immunol.*, 2004; 173: 7594–7601

- [17] Kim H.R., Wheeler M.A., Wilson C.M., Iida J., Eng D., Simpson M.A., McCarthy J.B., Bullard K.M.: Hyaluronan facilitates invasion of colon carcinoma cells *in vitro* via interaction with CD44. *Cancer Res.*, 2004; 64: 4569–4575
- [18] Kuang D.M., Wu Y., Chen N., Cheng J., Zhuang S.M., Zheng L.: Tumor-derived hyaluronan induces formation of immunosuppressive macrophages through transient early activation of monocytes. *Blood*, 2007; 110: 587–595
- [19] Larkin J., Renukaradhya G.J., Sriram V., Du W., Gervay-Hague J., Bruckiewicz R.R.: CD44 differentially activates mouse NK T cells and conventional T cells. *J. Immunol.*, 2006; 177: 268–279
- [20] Laurent T.C., Fraser J.R.: Hyaluronan. *FASEB J.*, 1992; 6: 2397–2404
- [21] Lokeshwar V.B., Young M.J., Goudarzi G., Iida N., Yudin A.I., Cherr G.N., Selzer M.G.: Identification of bladder tumor-derived hyaluronidase: its similarity to HYAL1. *Cancer Res.*, 1999; 59: 4464–4470
- [22] Majors A.K., Austin R.C., de la Motte C.A., Pyeritz R.E., Hascall V.C., Kessler S.P., Sen G., Strong S.A.: Endoplasmic reticulum stress induces hyaluronan deposition and leukocyte adhesion. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 47223–47231
- [23] Mascarenhas M.M., Day R.M., Ochoa C.D., Choi W.I., Yu L., Ouyang B., Garg H.G., Hales C.A., Quinn D.A.: Low molecular weight hyaluronan from stretched lung enhances interleukin-8 expression. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2004; 30: 51–60
- [24] McKee C.M., Lowenstein C.J., Horton M.R., Wu J., Bao C., Chin B.Y., Choi A.M., Noble P.W.: Hyaluronan fragments induce nitric oxide synthase in murine macrophages through a nuclear factor  $\kappa$ B-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 8013–8018
- [25] McKee C.M., Penno M.B., Cowman M., Burdick M.D., Strieter M.R., Bao C., Noble P.W.: Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J. Clin. Invest.*, 1996; 98: 2403–2413
- [26] Moseley R., Waddington R.J., Embery G.: Degradation of glycosaminoglycans by reactive oxygen species derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1997; 1362: 221–231
- [27] Mummert M.E., Mummert D., Edelbaum D., Hui F., Matsue H., Takashima A.: Synthesis and surface expression of hyaluronan by dendritic cells and its potential role in antigen presentation. *J. Immunol.*, 2002; 169: 4322–4331
- [28] Nedvetzki S., Gonen E., Assayag N., Reich R., Williams R.O., Thurmond R.L., Huang J.F., Neudecker B.A., Wang F.S., Turley E.A., Naor D.: RHAMM, a receptor for hyaluronan-mediated motility, compensates for CD44 in inflamed CD44-knockout mice: A different interpretation of redundancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 18081–18086
- [29] Neumann A., Schinzel R., Palm R., Riederer P., Munch G.: High molecular weight hyaluronic acid inhibits advanced glycation endproduct-induced NF- $\kappa$ B activation and cytokine expression. *FEBS Lett.*, 1999; 453: 283–287
- [30] Noble P.W.: Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biol.*, 2002; 21: 25–29
- [31] Ohkawara Y., Tamura G., Iwasaki T., Tanaka A., Kikuchi T., Shirato K.: Activation and transforming growth factor- $\beta$  production in eosinophils by hyaluronan. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2000; 23: 444–451
- [32] Pericle F., Sconocchia G., Titus J.A., Segal D.M.: CD44 is a cytotoxic triggering molecule on human polymorphonuclear cells. *J. Immunol.*, 1996; 157: 4657–4663
- [33] Prehm P.: Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. *Biochem. J.*, 1984; 220: 597–600
- [34] Scheibner K.A., Lutz M.A., Boodoo S., Fenton M.J., Powell J.D., Horton M.R.: Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J. Immunol.*, 2006; 177: 1272–1281
- [35] Schimizzi A.L., Massie J.B., Murphy M., Perry A., Kim C.W., Garfin S.R., Akeson W.H.: High-molecular-weight hyaluronan inhibits macrophage proliferation and cytokine release in the early wound of a preclinical postlaminectomy rat model. *Spine J.*, 2006; 6: 550–556
- [36] Sconocchia G., Campagnano L., Adorno D., Iacona A., Cococchetta N.Y., Boffo V., Amadori S., Casciani C.U.: CD44 ligation on peripheral blood polymorphonuclear cells induces interleukin-6 production. *Blood*, 2001; 97: 3621–3627
- [37] Sconocchia G., Titus J.A., Segal D.M.: CD44 is a cytotoxic triggering molecule in human peripheral blood NK cells. *J. Immunol.*, 1994; 153: 5473–5481
- [38] Screaton G.R., Bell M.V., Jackson D.G., Cornelis F.B., Gerth U., Bell J.I.: Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992; 89: 12160–12164
- [39] Simpson M. A.: Concurrent expression of hyaluronan biosynthetic and processing enzymes promotes growth and vascularization of prostate tumors in mice. *Am. J. Pathol.*, 2006; 169: 247–257
- [40] Sugahara K. N., Murai T., Nishinakamura H., Kawashima H., Saya H., Miyasaka M.: Hyaluronan oligosaccharides induce CD44 cleavage and promote cell migration in CD44-expressing tumor cells. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 32259–32265
- [41] Tamoto K., Nochi H., Tada M., Shimada S., Mori Y., Kataoka S., Suzuki Y., Nakamura T.: High-molecular-weight hyaluronic acids inhibit chemotaxis and phagocytosis but not lysosomal enzyme release induced by receptor-mediated stimulations in guinea pig phagocytes. *Microbiol. Immunol.*, 1994; 38: 73–80
- [42] Taylor K.R., Trowbridge J.M., Rudisill J.A., Termeer C.C., Simon J.C., Gallo R.L.: Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 17079–17084
- [43] Teder P., Vandivier R.W., Jiang D., Liang J., Cohn L., Pure E., Henson P.M., Noble P.W.: Resolution of lung inflammation by CD44. *Science*, 2002; 296: 155–158
- [44] Termeer C., Benedix F., Sleeman J., Fieber C., Voith U., Ahrens T., Miyake K., Freudenberg M., Galanos C., Simon J.C.: Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.*, 2002; 195: 99–111
- [45] Termeer C., Hennies J., Voith U., Ahrens T., Weiss J.M., Prehm P., Simon J.C.: Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. *J. Immunol.*, 2000; 165: 1863–1870
- [46] Tesar B.M., Jiang D., Liang J., Palmer S.M., Noble P.W., Goldstein D.R.: The role of hyaluronan degradation products as innate alloimmune agonists. *Am. J. Transplant.*, 2006; 6: 2622–2635
- [47] Toole B. P.: Hyaluronan promotes the malignant phenotype. *Glycobiology*, 2002; 12: 37R–42R
- [48] Wang C.T., Lin Y.T., Chiang B.L., Lin Y.H., Hou S.M.: High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006; 14: 1237–1247
- [49] Webb D.S., Shimizu Y., Van Seventer G.A., Shaw S., Gerrard T.L.: LFA-3, CD44, and CD45: physiologic triggers of human monocyte TNF and IL-1 release. *Science*, 1990; 249: 1295–1297
- [50] Weigel P.H., Hascall V.C., Tammi M.: Hyaluronan synthases. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 13997–14000
- [51] Wells A., Larsson E., Hanas E., Laurent T., Hallgren R., Tufwesson G.: Increased hyaluronan in acutely rejecting human kidney grafts. *Transplantation*, 1993; 55: 1346–1349
- [52] Zaman A., Cui Z., Foley J.P., Zhao H., Grimm P.C., DeLisser H.M., Savani R.C.: Expression and role of the hyaluronan receptor RHAMM in inflammation after bleomycin injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2005; 33: 447–454