

Streszczenie

mgr Michał Przemysław Pruchniak

Tworzenie i degradacja zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilów w chorobach autoimmunizacyjnych

**Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych
w zakresie biologii medycznej**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Urszula Demkow

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku
Rozwojowego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą I Wydziału Lekarskiego
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2019

Neutrofile stanowią pierwszą linię obrony organizmu przed patogenami tj. bakteriami, grzybami, wirusami i pierwotniakami. W tym celu neutrofile wykorzystują proces fagocytozy, degranulację ziarnistości zawierających antybakteryjne enzymy oraz generują powstawanie wolnych rodników tlenowych. Stosunkowo niedawno został odkryty nowy sposób zabijania patogenów opisany jako NETs. W przebiegu tego procesu neutrofile uwalniają zewnątrzkomórkowe sieciopodobne struktury nazwane zewnątrzkomórkowymi sieciami neutrofilowymi (*ang.* neutrophil extracellular traps, NETs), złożonymi z kwasów nukleinowych, histonów oraz enzymów. NETs posiadają zdolność do wychwytu i zabicia patogenów, a zjawisko to stanowi istotny mechanizm obronny w ciężkich zakażeniach. Proces wytwarzania NETs może zostać zainicjowany przez szereg czynników, takich jak kompleksy immunologiczne, składowe układu dopełniacza, czy obecność cytokin prozapalnych. W ostatnich latach opublikowano szereg doniesień wskazujących na udział NETs w etiologii i patogenezie chorób o podłożu autoimmunizacyjnym, zapalnym czy nowotworowym.

Celem niniejszej pracy była ocena procesu uwalniania NETs przez granulocyty izolowane z krwi obwodowej osób cierpiących na choroby o podłożu autoimmunizacyjnym. Dodatkowo zbadano wpływ leczenia chorych na uwalnianie NETs. Zbadano również wpływ osocza pacjentów i osób zdrowych na degradację zewnątrzkomórkowego DNA w warunkach *in vitro*. Podjęto również próbę oceny polimorfizmu genu DNASE I, kodującego enzym degradujący NETs w ustroju. Z uwagi na fakt, iż w warunkach *in vivo* na komórki może działać równolegle kilka czynników aktywujących, w drugiej części pracy oceniono wytwarzanie NETs przez granulocyty obojętnochłonne osób zdrowych po aktywacji różnymi kombinacjami poprzednio użytych stymulatorów.

Do badania włączono 121 osób w wieku od 18 do 66 lat. W obrębie grupy badanej u 26 osób zdiagnozowano ziarniniakowatość z zapaleniem naczyń (*ang.* granulomatosis with polyangiitis, GPA), a u 28 układowy toczeń rumieniowaty (*ang.* systemic lupus erythematosus, SLE). Do badania rekrutowano chorych w momencie rozpoznania choroby (przed włączeniem leczenia) lub w przypadku gdy leczenie było wdrożone od co najmniej 12 miesięcy. Grupę kontrolną stanowili zdrowi ochotnicy. Granulocyty 37 osób zdrowych wykorzystano jako kontrolę do badania tworzenia NETs przez granulocyty chorych na SLE/GPA, natomiast próbki kolejnych 30 osób wykorzystano do zbadania kinetyki powstawania NETs z zastosowaniem kombinacji stymulatorów.

Zdolność do tworzenia NETs była analizowana w przypadku granulocytów niestymulowanych oraz po ich aktywacji za pomocą PMA (*ang.* phorbol myristate acetate), fMLP (*ang.* N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine), CaI (*ang.* calcium ionophore) lub ich kombinacji. Uwalnianie NETs oceniano ilościowo za pomocą fluorymetrii (6 punktów czasowych) oraz jakościowo za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. Zdolność do degradacji zewnątrzkomórkowego DNA przez osocze pacjentów przebadano za pomocą fluorymetrii. Gen *DNASE I* został zsekwencjonowany metodą Sangera w celu sprawdzenia obecności polimorfizmów SNP.

Wykazano, że stymulowane neutrofile chorych produkują więcej NETs niż neutrofile grupy kontrolnej. Największa różnica wynosząca 82,5% była obserwowana w przypadku stymulacji PMA. Nie zaobserwowano natomiast różnic między osobami chorymi a grupą kontrolną gdy stymulatorem było fMLP. Interesującym odkryciem było stwierdzenie różnic w wyrzucie NETs przez granulocyty chorych na obie badane choroby. Granulocyty chorych na GPA wykazały średnio o 68,5% wyższą produkcję NETs niż neutrofile chorych na SLE. W przypadku chorych w trakcie leczenia proces tworzenia się NETs utrzymywał się na poziomie kontroli negatywnej, a obserwacja mikroskopowa potwierdziła zahamowanie procesu NETozy. Dodatkowo wykazano obniżoną zdolność do degradacji zewnątrzkomórkowego DNA, zarówno u osób z GPA, jak i SLE, w porównaniu z grupą kontrolną. Analiza sekwencyjna genu dla DNazyI wykazała obecność trzech polimorfizmów SNP mogących mieć związek z obniżoną zdolnością degradacji NETs u tych pacjentów ($p \leq 0,0001$). W drugiej części pracy przebadano wpływ kombinacji stymulatorów na wyrzut NETs. Wykazano, że stymulacja komórek poprzez kombinację PMA/fMLP, PMA/CaI oraz fMLP/CaI powoduje znamienne niższy wyrzut NETs niż stymulacja za pomocą PMA ($p \leq 0,0001$), bądź CaI ($p \leq 0,0001$). Ponadto, wykazano iż, stymulacja granulocytów trzema stymulatorami całkowicie hamuje proces tworzenia NETs na jego wczesnym etapie.

Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że granulocyty obojętnochłonne chorych na SLE i GPA posiadają nasiloną zdolność do wyrzutu NETs w porównaniu do granulocytów osób zdrowych, dodatkowo neutrofile chorych na GPA i SLE różnią się zdolnością do wyrzutu sieci po stymulacji na drodze niezależnej od oksydazy NADPH. Zwiększona produkcja NETs może przyczyniać się do powstania tych chorób i może nasilać proces zapalny w ich przebiegu. Ponadto, wyniki pokazują, że zbyt intensywna stymulacja granulocytów nie tylko obniża ilość wytworzonych NETs, ale może zatrzymać ten

proces całkowicie. Wnioskuję się, że w przypadku osób zdrowych istnieją wewnątrzkomórkowe mechanizmy regulujące nadmierną produkcję NETs co może chronić organizm przed rozwojem autoimmunizacji.

Dariusz Pruchniak