

mgr Aneta Manda-Handzlik

**Rola reaktywnych form azotu
w tworzeniu zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

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

Promotor pomocniczy: dr n. med. Małgorzata Wachowska

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej
Wieków Rozwojowego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2019

Małgorzata Wachowska

Aneta Manda-Handzlik

KIEROWNIK
Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej i
Immunologii Klinicznej Wieków Rozwojowego

prof. dr hab. n. med. Urszula Demkow

Streszczenie

Neutrofile stanowią pierwszą linię obrony przed zakażeniem i są odpowiedzialne za niszczenie drobnoustrojów. Jednym z mechanizmów efektorowych wykorzystywanych przez te komórki jest tworzenie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (ang. neutrophil extracellular traps, NETs). Struktury te są zbudowane z DNA i białek, a ich rolą jest ograniczenie rozprzestrzeniania się i unieszkodliwienie patogenów. Stwierdzono również, że zaburzone tworzenie NETs może odgrywać istotną rolę w patogenezie niektórych chorób, takich jak choroby autoimmunizacyjne, mukowiscydoza czy choroby zakrzepowo-zatorowe. Z tego powodu niezwykle ważne jest poznanie mechanizmów zaangażowanych w proces powstawania NETs. Pozwoli to na poszerzenie wiedzy dotyczącej funkcjonowania komórek odpornościowych, jak również może doprowadzić do zrozumienia podłoża niektórych chorób oraz zasugerować nowe strategie ich leczenia.

Obecnie wiadomo, że powstawanie NETs może być zależne od aktywacji kilku różnych mechanizmów, w tym syntezy reaktywnych form tlenu (RFT). Mimo iż z syntezą RFT ściśle wiąże się produkcja pokrewnej rodziny związków chemicznych – reaktywnych form azotu (RFA), to rola RFA w procesie powstawania NETs nie została do tej pory szczegółowo poznana. Z tego powodu celem niniejszej pracy było zbadanie mechanizmu leżącego u podstaw tworzenia NETs indukowanego przez RFA oraz zbadanie roli RFA jako związków pośredniczących w procesie tworzenia NETs.

Do badań wykorzystano ludzkie neutrofile, które izolowano z krwi obwodowej zdrowych ochotników, w tym krwiodawców, oraz z krwi chorych na przewlekłą chorobę ziarniniakową (ang. chronic granulomatous disease, CGD). Oprócz ludzkich komórek pierwotnych, do badań wykorzystano komórki linii HL-60 różnicowane w komórki granulocytopodobne.

W ramach prowadzonych badań nad mechanizmami uwalniania NETs, zoptymalizowano model eksperymentalny oparty na różnicowaniu komórek linii HL-60. Komórki granulocytopodobne uzyskane na drodze różnicowania komórek HL-60 za pomocą dimetyloformamidu (DMF) bardziej wydajnie uwalniały NETs niż komórki HL-60 różnicowane kwasem all-trans-retinowym lub dimetylosulfotlenkiem. Co więcej, komórki zróżnicowane za pomocą DMF wykazywały najbardziej zbliżone właściwości do granulocytów izolowanych z krwi obwodowej w zakresie cytrulinacji histonu H3, produkcji RFT oraz autofagii. Z tego powodu w trakcie dalszych badań stosowano komórki różnicowane za pomocą DMF.

Wykazano, że egzogenne RFA, tj. NO (jako stymulator stosowano donor NO: S-nitrozo-N-acetylo-D,L-penicylaminę, SNAP) oraz ONOO⁻, pobudzają uwalnianie NETs przez ludzkie granulocyty. W przypadku komórek HL-60 różnicowanych DMF nie zaobserwowano tworzenia

NETs po stymulacji za pomocą RFA. W komórkach HL-60 nie uzyskano również nadekspresji genu *NOS2*, kodującego indukowalną syntazę tlenku azotu, mimo wykazania nadekspresji genu dla lucyferazy w komórkach HL-60 transdukowanych plazmidem kontrolnym oraz uzyskania nadekspresji genu *NOS2* w komórkach HEK 293T. Z tego powodu do badań mechanizmu tworzenia RFA wykorzystano wyłącznie neutrofile izolowane z ludzkiej krwi obwodowej. W trakcie dalszych badań udowodniono, że zdolność NO oraz ONOO⁻ do indukcji powstawania NETs zależy od aktywności elastazy neutrofilowej oraz kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K), a także wykazano, że zahamowanie PI3K zmniejsza produkcję RFT przez neutrofile. Zmniejszenie dostępności RFT poprzez zahamowanie aktywności mieloperoksydazy lub dodatek przeciwutleniacza N-acetylocysteiny zapobiegało uwalnianiu NETs po stymulacji za pomocą RFA. Badania z zastosowaniem farmakologicznych inhibitorów oksydazy zredukowanego fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH) oraz z wykorzystaniem granulocytów izolowanych od chorych na CGD, u których stwierdza się genetycznie uwarunkowany defekt oksydazy NADPH, pozwoliły wykazać, że aktywność oksydazy NADPH jest niezbędna dla uwolnienia NETs po stymulacji donorem NO, ale nie ONOO⁻. Zaobserwowano również, że po stymulacji za pomocą octanu mirystynianu forbolu (PMA) i jonoforu wapnia A23187 (CI) granulocyty syntetyzują RFA. Usunięcie RFA ze środowiska granulocytów poprzez użycie specyficznych zmiataczy lub zastosowanie inhibitorów NOS zaburzało proces powstawania NETs po stymulacji za pomocą PMA oraz CI. RFA wydajnie indukowały powstawanie NETs gdy były używane jako jedyne stymulatory oraz nasilały zjawisko tworzenia NETs po indukcji za pomocą fizjologicznych stymulatorów, takich jak lipopolisacharyd i czynnik aktywujący płytki.

Podsumowując, w niniejszych badaniach wykazano istotną rolę oraz mechanizm działania RFA w procesie uwalniania NETs. Egzogenne RFA mogą same indukować tworzenie NETs przez granulocyty oraz potęgować działanie innych stymulatorów. W zależności od rodzaju stymulatora, RFA mogą również być syntetyzowane podczas tworzenia NETs i przyczyniać się do nasilenia tego procesu.