

Powstawanie przeciwciał przeciwneutrofilowych (ANCA) w kontekście formowania zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NETs)

Formation of anti-neutrophilic antibodies (ANCA) in the context of Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

JUSTYNA PASTUSZAK¹, MARZENA GARLEŃ²

¹ Medyczne Laboratorium Diagnostyczne Beskidzkiego Centrum Medycznego Sp. z o.o., ul. Młodzieżowa 21, 43-300 Bielsko-Biała

² Zakład Immunologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, ul. J. Waszyngtona 15A, 15-269 Białystok

Streszczenie

Przeciwciała przeciwneutrofilowe – ANCA skierowane są przeciw składowym cytoplazmy granulocytów obojętnochłonnych, a ich obecność obserwowana jest m.in. u osób z zapaleniem małych naczyń. Przeciwciała te zostały wykryte prawie 40 lat temu, ale mechanizmy ich powstawania, nie są dokładnie poznane. Antygeny docelowe dla przeciwciał ANCA, takie jak mieloperoksydaza (MPO) oraz proteinaza 3 (PR3), wchodzą w skład ziarnistości znajdujących się w cytoplazmie neutrofilów. Granulocyty obojętnochłonne, pełniąc istotną rolę w nieswoistej odporności organizmu, po aktywacji mogą wyrzucać zewnątrzkomórkowe pułapki NETs, które mają zdolność do unieruchomienia i unieszkodliwienia patogenów. Wyeksponowane w NETs antygeny MPO i PR3 mogą zostać zaprezentowane komórkom układu odpornościowego i uruchomić kaskadę tworzenia autoprzeciwciał ANCA, które z kolei przyczyniają się do zapętlenia procesów autoreaktywności neutrofilów. Celem pracy było wyjaśnienie potencjalnej roli NETs w procesach powstawania przeciwciał ANCA.

Słowa kluczowe: neutrofil, zewnątrzkomórkowe sieci neutrofilowe (NETs), przeciwciała przeciwneutrofilowe (ANCA), mieloperoksydaza (MPO), proteinaza 3 (PR3)

Summary

Anti-neutrophilic antibodies – ANCA are directed against a component of the cytoplasm of neutrophils, and their presence is observed in people with inflammation of the small vessels. These antibodies were discovered almost 40 years ago, but the mechanisms of their formation are not fully understood. Target antigens for ANCA antibodies, such as myeloperoxidases (MPO) and proteinase 3 (PR3), are part of the granules found in the cytoplasm of neutrophils. Neutrophils, playing an important role in the nonspecific immunity of the organism, can eject extracellular NETs traps when activated, which have the ability to immobilize and inactivate pathogens. The MPO and PR3 antigens exposed in NETs can be presented to the cells of the immune system and trigger the cascade of ANCA autoantibody formation, which in turn contributes to the looping of the neutrophil autoreactivity processes. The aim of the study was to explain the potential role of NETs in the production of ANCA antibodies

Keywords: neutrophil, neutrophil extracellular traps (NETs), anti-neutrophilic antibodies (ANCA), myeloperoxidase (MPO), proteinase 3 (PR3)

© *Alergia Astma Immunologia* 2022, 27 (4): 112-118

www.alergia-astma-immunologia.pl



Adres do korespondencji / Address for correspondence

Justyna Pastuszek

Medyczne Laboratorium Diagnostyczne Beskidzkiego Centrum Medycznego Sp. z o.o.,

ul. Młodzieżowa 21, 43-300 Bielsko-Biała

e-mail: justyna.pastuszek-bcm@wp.pl, tel. 33 826 34 44

1. Wstęp

Neutrofile stanowią ważny element nieswoistych mechanizmów obronnych, ponieważ jako pierwsze wśród leukocytów pojawiają się w miejscu odpowiedzi immunologicznej. Badania nad zjawiskiem wyrzucania, przez pobudzone neutrofile, zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NETs) angażują środowisko naukowe w ostatnich latach. Zewnątrzkomórkowe sieci umożliwiają schwytanie i unieszkodliwienie bakterii, wirusów, grzybów, a nawet komórek nowotworowych. Pojawiają się liczne dowody

na współuczestnictwo sieci neutrofilowych w patogenezie wielu chorób, w tym o podłożu autoimmunologicznym. Dokładne poznanie roli NETs w przebiegu tych jednostek chorobowych może przyczynić się do ich dokładniejszej i wcześniejszej diagnostyki, lepszego rokowania, a nawet opracowania nowych strategii terapeutycznych.

W niniejszej pracy przeglądowej przedstawiono poznane dotychczas zależności pomiędzy wyrzucanymi przez neutrofile zewnątrzkomórkowymi pułapkami – NETs a przeciwciałami przeciw cytoplazmie neutrofilów – ANCA, któ-

re występują u osób z zapaleniem małych naczyń. Podczas przygotowywania manuskryptu przeanalizowano dostępną literaturę w bazach naukowych wyszukaną na podstawie słów kluczowych, zawężając kryteria do chorób autoimmunologicznych, posiłkując się monografiami w zakresie podstawowych danych.

2. Neutrofile

2.1 Charakterystyka ogólna

Neutrofil, granulocyt obojętnochłonny z segmentowym jądrem, zwany również leukocytem polimorfonuklearnym (ang. *polymorphonuclear leukocyte* – PMN), jest dojrzałą i w pełni wykształconą komórką układu granulocytarnego o średnicy 12-15 μm . Neutrofile stanowią dominującą populację wśród granulocytów, stanowiąc jednocześnie 50-75 % wszystkich leukocytów [1,2]. Granulocyty obojętnochłonne wytwarzane są w szpiku kostnym, z którego przechodzą do krwiobiegu, gdzie przebywają do kilkunastu godzin, po czym ulegają apoptozie lub przemieszczają się do tkanek, w których pełnią swoją rolę do 4 dni [3,4].

Nazwa *polymorphonuclear leukocyte* pochodzi od budowy jądra komórkowego, które stanowi od 2 do 5 segmentów połączonych nitkami chromatyny [1,2]. W cytoplazmie neutrofilów rozróżnia się cztery rodzaje ziarnistości: pierwszorzędowe, drugorzędowe, trzeciorzędowe oraz wydzielnicze. Ziarnistości pierwszorzędowe tzw. azurofilne, pojawiają się już w stadium promielocyta, a w ich skład wchodzi białka oraz enzymy, między innymi: α -1 antytrypsyna, defensyny, elastaza, β -galaktozydaza, β -glukuronidaza, katepsyna G, kwaśna fosfataza, mieloperoksydaza, 5'-nukleozydaza, proteinaza 3 [3-6]. Ziarnistości drugorzędowe pojawiające się w stadium mielocyta i metamielocyta, są specyficzne dla neutrofilów stanowiąc 80-90% wszystkich ziaren. Ziarnistości te zawierają między innymi: aktywator plazminogenu, fagocytynę, haptoglobinę, histaminazę, kolagenazę, metaloproteinazę macierzy zewnątrzkomórkowej 9 (MMP-9), laktoferynę, lizozym [5,6]. Trzeciorzędowe ziarnistości powstają w ostatnich stadiach rozwojowych neutrofilów i zawierają żelatynę [5,6]. Ziarnistości wydzielnicze są pęcherzykami wydzielniczymi, które powstają przez wpuklenie błony komórkowej do wnętrza neutrofila, zawierającymi białka błonowe, fosfatazę zasadową, albuminę [5]. Komórka neutrofila zawiera w niewielkiej ilości inne organelle cytoplazmatyczne, jak mitochondria i aparat Golgiego [2].

2.2 Funkcje i mechanizmy działania

Neutrofile odgrywają znaczącą rolę we wrodzonej odporności organizmu. Są jednymi z pierwszych komórek, które zrekrutowane przez czynniki chemotaktyczne, takie jak białko C5a układu dopełniacza, IL-8, leukotrieny B₄, pojawiają się w miejscu urazu bądź infekcji. W momencie aktywacji granulocytów obojętnochłonnych białka pęcherzyków wydzielniczych ułatwiają komórkom adhezję do śródbłonna naczyń krwionośnych i przedostanie się do tkanki. Proces ten nazwany diapedezą, wspomagają białka ziarnistości trzeciorzędowych neutrofilów [7].

Po rozpoznaniu patogenu neutrofile posiadają zdolność pochłonięcia go na drodze fagocytozy. Patogen zamknięty w powstałym fagosomie może zostać zabity m.in. na drodze reakcji tlenowych z udziałem reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species* – ROS). Toksyczne związki

tlenu charakteryzują się silnym działaniem uszkadzającym struktury komórkowe bakterii, grzybów, pasożytów oraz komórek nowotworowych. Podobnie do ROS działają reaktywne formy azotu (ang. *reactive nitrogen species* – RNS) [8,9].

Ponadto, białka i enzymy zawarte w ziarnistościach neutrofilów zostają uwolnione do wnętrza fagolizosomu, gdzie unieszkodliwiają patogeny w beztlenowym mechanizmie wewnątrzkomórkowego zabijania [9].

Neutrofile mogą także uwalniać zawartość ziarnistości na zewnątrz komórki w procesie zwanym degranulacją, najczęściej wobec patogenów dużych rozmiarów, których nie są w stanie sfagocytować. Po spełnieniu swojej funkcji granulocyty ulegają apoptozie, czyli programowanej śmierci komórkowej [6].

Innym rodzajem śmierci neutrofila jest NEToza, która związana jest z pośmiertnym przeciwdrobnoustrojowym działaniem tych komórek. Granulocyty tworzą zewnątrzkomórkowe pułapki w postaci sieci neutrofilowych (ang. *neutrophil extracellular traps* – NETs), dzięki którym chwytają i niszczą patogeny [8,9].

3. Zewnątrzkomórkowe sieci neutrofilowe - NETs

3.1 Morfologia i funkcja sieci

Zewnątrzkomórkowe sieci neutrofilowe pierwszy raz zostały opisane w 2004 roku. NETs stanowią wyrzucane poza komórkę struktury, złożone ze zdekondensowanej chromatyny oraz białek i enzymów pochodzących z ziarnistości granulocytów [10].

Włókna chromatyny budujące NETs mają średnice ok. 15-17 nm, zawierają DNA stanowiące szkielet sieci, w który uplecione są histony H1, H2A, H2B, H3 i H4. Nici DNA/ chromatyny łączą się w większe trójwymiarowe struktury, które mogą osiągać setki nanometrów długości i szerokości. DNA wchodzące w skład NETs może być pochodzenia jądrowego bądź mitochondrialnego [17]. Pomiędzy włóknami DNA znajduje się ok. 20-30 różnych białek przeciwbakteryjnych, proteaz oraz białek cytoszkieletu i enzymów glikolitycznych, takich jak: elastaza neutrofilowa (NE), mieloperoksydaza (MPO), lizozym, laktoferyna, katepsyna G, proteinaza 3 (PR3), żelatynaza, białko HMGB1 (ang. *high mobility group box 1* – HMGB1) i LL-37 (ludzka katelicydyna, peptyd przeciwdrobnoustrojowy, który zawiera 37 reszt aminokwasowych). Część białek NETs tworzy między sobą specyficzne kowalencyjne wiązania krzyżowe, które dodatkowo stabilizują całą strukturę sieci [11,12,13]. Na rycinie 1 przedstawiono schemat budowy NETs.

Pozakomórkowe pułapki neutrofilowe odgrywają istotną rolę w obronie gospodarza. NETs posiadają zdolność przylegania, wychwytywania i unieruchamiania patogenów takich jak bakterie, grzyby, wirusy, a nawet pasożyty. Dzięki zawartym w sieci proteazom czy histonom, NETs mają zdolność bezpośredniego zabijania unieruchomionych drobnoustrojów. Stwierdzono, że sieci neutrofilowe mogą opsonizować niektóre rodzaje grzybów (*A. fumigatus*), hamować ich wzrost (*Aspergillus*) oraz zabijać (*Candida albicans*). Wykazano jednak, że niektóre bakterie wytworzyły mechanizmy obronne przed działaniem sieci, np. paciorkowce grupy A produkując DNAzę unikają schwymania w pułapkę lub wykorzystują NETs do tworzeniu biofilmu [15,16].

Z jednej strony NETs działają na korzyść gospodarza, wykazując właściwości obronne przed patogenami, z drugiej zaś udowodniono, że mają swój udział w przebiegu posocznicy, chorobie zakrzepowej, przerzutach nowotworowych oraz chorobach autoimmunologicznych [11,15].

3.2 Mechanizm powstawania NETs

Proces uwalniania NETs, do którego dochodzi na skutek aktywowanej śmierci komórki nazywany jest NETozą i stanowi odrębny rodzaj śmierci komórkowej neutrofilów niż apoptoza i nekroza. Aktywowane neutrofile wyrzucają swoje sieci w odpowiedzi na bodźce. Do poznanych czynników indukujących uwalnianie NETs zaliczamy bakterie i grzyby, cytokiny takie jak IL-8 lub TNF- α , a także kompleksy immunologiczne oraz aktywowane płytki krwi [16,17].

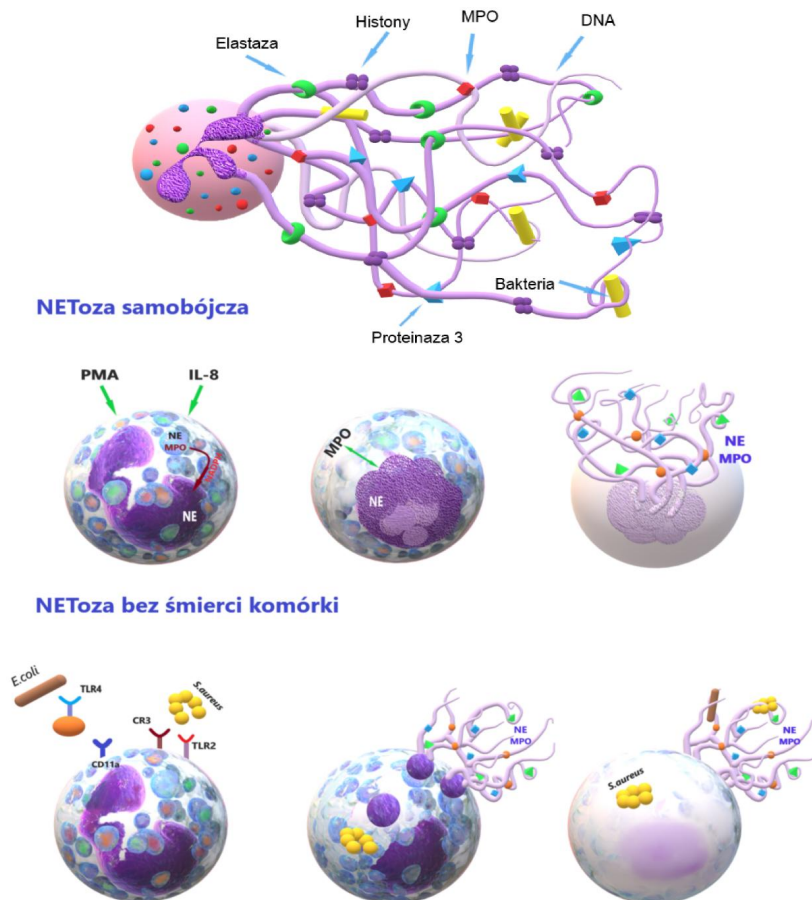
Tworzenie sieci neutrofilowych obserwuje się zarówno w naczyniach krwionośnych jak i tkankach, a proces ich uwolnienia może zachodzić różnymi ścieżkami, których wzajemne zależności nie są dokładnie poznane [17]. Przyjmuje się, że tworzenie NETs może odbywać się na drodze trzech różnych mechanizmów, w wyniku lizy komórek, uwalnianie struktur przez żywe komórki poprzez tworzenie pęcherzyka z jądrowym DNA lub przyżyciowe formowanie sieci tworzonych z mitochondrialnego DNA [16]. Schematyczne przedstawienie tych procesów obrazuje rycina 1.

Mechanizm „klasycznej NETozy”, zakończony śmiercią komórki, angażuje zjawisko „wybuchu oddechowego” z udziałem oksydazy NADPH. Reaktywne formy tlenu wywołują dezintegrację błony jądrowej i dużej części błon

ziarnistości. W kolejnym etapie następuje przemieszczenie się mieloperoksydazy, elastazy neutrofilowej i LL-37 do jądra komórki. Elastaza neutrofilowa pomaga w rozszczepieniu histonów, podczas gdy MPO prowadzi do rozzerwania błony jądrowej oraz nasila wewnątrzkomórkową dekondensację chromatyну, która wchodzi w bezpośredni kontakt ze składnikami cytoplazmy, mieszając się z zawartością ziarnistości neutrofilów. Podczas przerwania błony cytoplazmatycznej komórki, utworzone NETs są uwalniane na zewnątrz neutrofila. W badaniach *in vitro* proces od stymulacji neutrofilów do uwolnienia NETs trwał do 4 godzin [11,16,18,19].

Uwolnienie sieci neutrofilowych przez żywe komórki charakteryzuje się szybkim, pęcherzykowym wyrzutem jądrowego DNA, już w kilka minut po pobudzeniu neutrofila. W procesie tym segmentowane jądro ulega zaokrągleniu i dekondensacji, następuje pęknięcie otoczki jądrowej oraz uwalnianie pęcherzyków z upakowanym DNA. Integralność błon plazmatycznych komórek uwalniających pęcherzyki z NETs zostaje zachowana. Szlak ten wydaje się być niezależny od reaktywnych form tlenu. Proces może być pobudzony bezpośrednią interakcją neutrofilów z płytkami krwi uprzednio zaktywowanymi przez receptor TLR4, poprzez cząsteczkę CD11a. W przypadku bakterii Gram dodatnich aktywacja następuje przez receptor TLR2 i receptor dla składowych dopełniacza 3 (CR3) [11,15,16].

Formowanie NETs tworzonych z mitochondrialnego DNA, zachodzi przy udziale reaktywnych form tlenu, ale nie wiąże się ze śmiercią komórki [20].



Ryc. 1. Schemat budowy zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych / Dwa mechanizmy formowania NETs.

4. Przeciwciała przeciw cytoplazmie neutrofilów

4.1 Charakterystyka i podział przeciwciał

ANCA

Przeciwciała przeciw cytoplazmie neutrofilów – ANCA (ang. *anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*) są auto-przeciwciałami skierowanymi przeciwko antygenom wchodzącym w skład cytoplazmy granulocytów obojętnochłonnych. Pierwszy raz przeciwciała te zostały opisane w 1982 roku [21,22].

Przy pomocy immunofluorescencji pośredniej IIFT (ang. *indirect immunofluorescence test*), z wykorzystaniem granulocytów utrwalonych etanolem jako substratu, można wyodrębnić następujące typy przeciwciał ANCA: o typie świecenia cytoplazmatycznym tzw. cANCA (ang. *cytoplasmic*), o typie świecenia okołojądrowym tzw. pANCA (ang. *perinuclear*) oraz atypowe tzw. aANCA [23]. Lokalizacja przeciwciał pANCA i cANCA w neutrofilach przedstawiona została w postaci zdjęć z mikroskopu fluorescencyjnego na rycinie 2.

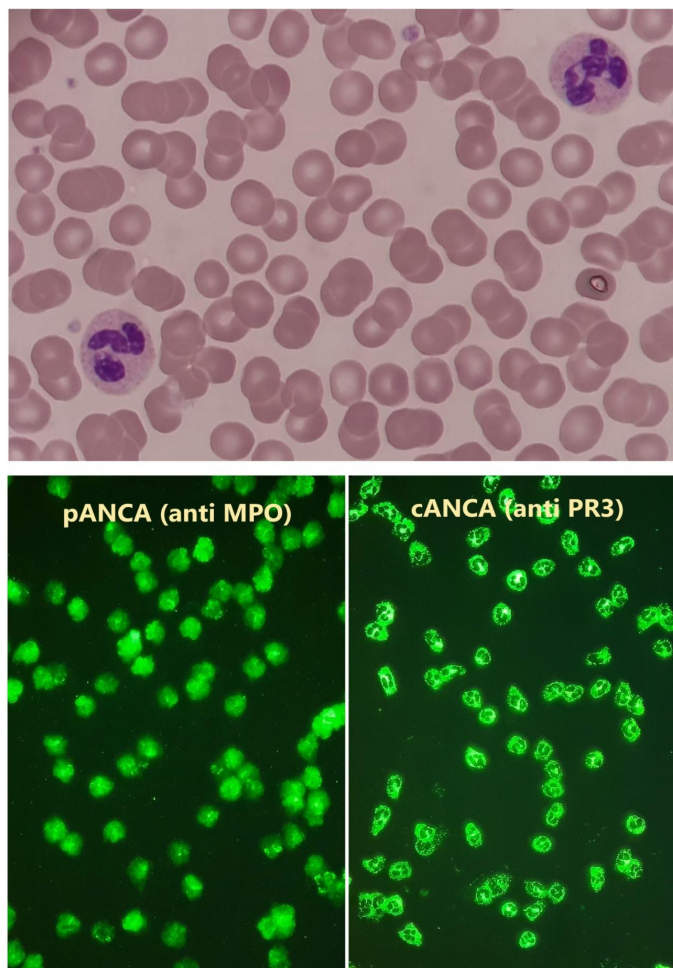
Antygenem dla przeciwciał cANCA jest proteina 3 lub bakteriobójcze białko zwiększające przepuszczalność błony bakterii Gram ujemnych (ang. *bactericidal permeability increasing protein* – BPI). Dla przeciwciał pANCA antygenem docelowym jest przede wszystkim mieloperoksydaza, ale również laktoferyna, katepsyna G, elastaza, lizozym, enolaza oraz inne składniki cytoplazmy neutrofilów. Przeciwciała

atypowe ANCA w teście immunofluorescencji pośredniej zazwyczaj prezentują dodatnie świecenie w kierunku pANCA, ale w teście ELISA są ujemne zarówno dla ANCA-MPO, jak i ANCA-PR3 [23].

4.2 Występowanie i znaczenie kliniczne ANCA

Przeciwciała skierowane przeciwko cytoplazmie neutrofilów odgrywają istotną rolę w patogenezie zapalenia naczyń, obejmujących głównie małe naczynia. Do zapalenia naczyń związanych z przeciwciałami ANCA (ang. *ANCA-associated vasculitis* – AAV) według ustaleń *Chappel Hill Consensus Conference (CHCC 2012) on the Nomenclature of Systemic Vasculitis* zalicza się: mikroskopowe zapalenie naczyń (ang. *microscopic polyangiitis* – MPA), ziarniniakowatość z zapaleniem naczyń/dawniej Wegenera (ang. *granulomatosis with polyangiitis* – GPA), eozynofilową ziarniniakowatość z zapaleniem naczyń/wcześniej zespół Churga-Straussa (ang. *eosinophilic granulomatosis with polyangiitis* – EGPA) [24,25,26]. AAV może manifestować się różnymi objawami sugerującymi przewlekłą chorobę zapalną jak gorączka, osłabienie, utrata masy ciała. Najczęściej choroba atakuje górne drogi oddechowe, płuca, nerki, oczy, skórę i nerwy obwodowe [27].

Związek ANCA z poszczególnymi typami zapalenia naczyń jest różny, 80-90% osób z GPA i MPA ma dodatni wynik w kierunku przeciwciał przeciwnetrofilowym,



Ryc. 2. Granulocyty obojętnochłonne z jądrem segmentowym, obraz mikroskopowy / Lokalizacja przeciwciał pANCA i cANCA w neutrofilach, obraz z mikroskopu fluorescencyjnego.

a w przypadku EGPA tylko 40% pacjentów. Rodzaj występujących przeciwciał ANCA zależy od podtypu AAV. MPA jest głównie związany z przeciwciałami przeciwko mieloperoksydazie (ANCA-MPO), podczas gdy pacjenci z GPA częściej posiadają przeciwciała przeciwko proteinazie 3 (ANCA-PR3). Atypowe ANCA są nieswoiste, obserwuje się je w wielu różnych schorzeniach [23,26].

Przeciwciała ANCA są również wykrywane w innych chorobach związanych z zapaleniami naczyń np. wywołanych lekami, w kolagenozach, nieswoistym zapaleniu jelit, czy też pierwotnym stwardniającym zapaleniu dróg żółciowych [28].

Dokładna przyczyna powstania autoimmunologicznych przeciwciał ANCA pozostaje niejasna. Najprawdopodobniej patogenezą obejmuje złożony proces, w którym współuczestniczy wiele elementów, takich jak infekcje, cechy genetyczne, czynniki środowiskowe, przyjmowane leki oraz nieprawidłowości w zakresie wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej. Rola, jaką każdy z tych czynników odgrywa w indukcji produkcji autoprzeciwciał, a także utrzymującego się patogennego działania ANCA jest różna u badanych osób [28].

Jedną z proponowanych przyczyn powstawania przeciwciał ANCA związana jest z autoimmunologiczną odpowiedzią na peptydy, które są podobne do peptydów w antygenach docelowych dla przeciwciał, np. *Staphylococcus aureus* posiadają peptyd podobny do cPR3 [28,29].

Badania dowodzą związku pomiędzy przyjmowaniem niektórych leków (propylotiouracyl, minocyklina, allopurydol, D-penicylamina i difenylhydantoina) i wykrywaniem przeciwciał ANCA. Wykazano zależność pomiędzy zapaleniem naczyń związanym z ANCA a narażeniem na wysokie stężenia pyłów, rtęci, krzemionki oraz ołowiu [30,31].

Wykazano również, że predyspozycje genetyczne mogą wpływać na rozwój zapaleń naczyń z ANCA. Zapalenie naczyń PR3-ANCA jest związane z polimorfizmami pojedynczego nukleotydu (SNP) w obszarze HLA-DP1 i genami kodującymi PR3 (PRTN3) oraz $\alpha 1$ antytrypsyną (SERPINA1), która jest inhibitorem dla proteiny 3. Dla pacjentów z typem MPO-ANCA stwierdzono powiązanie z SNP w HLA-DQ [28,32].

Istnieją liczne dowody potwierdzające udział przeciwciał ANCA w patogenezie zapaleń naczyń. Niektóre badania podają, że wysokie miano przeciwciał koreluje z aktywnością choroby. Wysoki poziom przeciwciał ANCA stwierdza się u większości osób z aktywnym mikroskopowym zapaleniem naczyń oraz z ziarniniakowatością z zapaleniem naczyń [28].

Ekspresja powierzchniowa autoantygenów dla ANCA, takich jak MPO czy PR3, jest wysoka w aktywowanych przez czynniki zapalne neutrofilach, przy niskiej bądź braku obecności w niepobudzonych granulocytach obojętnochłonnych. Obserwacje te przemawiają za tezą, że zainicjowany w przebiegu infekcji wzrost krążących we krwi cytokin powoduje pobudzenie neutrofilów oraz ich interakcję z przeciwciałami skierowanymi przeciw ich cytoplazmie. Zaktywowane neutrofile mogą uszkadzać komórki śródbłonna naczyń na drodze różnych mechanizmów. Przeciwciała ANCA w klasie IgG stymulują przyleganie, rolowanie i migrację PMNs przez śródbłonek naczyń przy udziale integryn. Docelowe dla ANCA antygeny oraz kompleksy immunologiczne, w których skład wchodzi przeciwciała, mogą odkładać się w ścianach naczyń i przyczyniać do ich

uszkodzenia. Ponadto, przeciwciała ANCA wykazują zdolność do stymulacji granulocytów obojętnochłonnych do uwalniania zewnątrzkomórkowych pułapek – NETs, które również mogą uszkadzać komórki śródbłonna [26,28,33].

5. Przeciwciała przeciwnetrofilowe a NETs

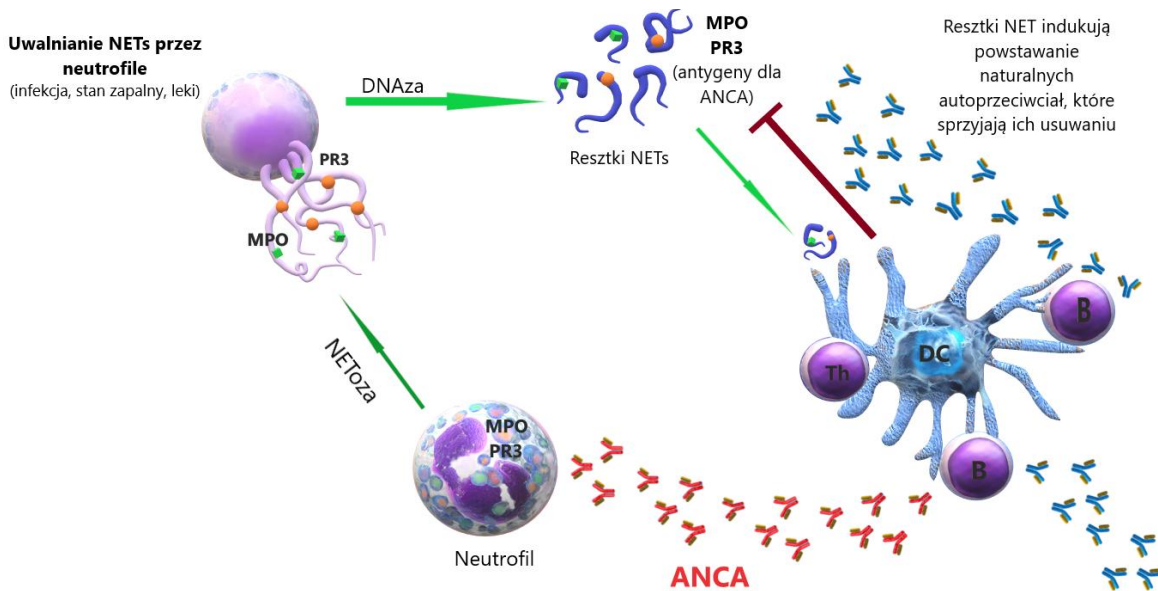
Obecność sieci neutrofilowych wykazano w przebiegu chorób autoimmunologicznych. Badania potwierdzają, że zarówno powstawanie NETs i ich interakcje z innymi komórkami układu odpornościowego, jak również upośledzenie usuwania sieci może przyczynić się do przełamania autotolerancji i wytworzenia autoprzeciwciał [34].

Wchodzące w skład NETs mieloperoksydaza oraz proteinaza 3 stanowią antygeny docelowe dla przeciwciał ANCA. Pozakomórkowa obecność MPO czy PR3 w sieci chromatyny umożliwia im zachowanie swojej funkcjonalności, co może być przyczyną aktywacji patologicznych przeciwciał i rozwoju choroby autoimmunologicznej. W neutrofilach spoczynkowych PR3 ulega ekspresji na błonie komórkowej, natomiast MPO znajduje się w ziarnistościach granulocytów. Po pobudzeniu granulocytów obojętnochłonnych przez prozapalne cytokiny np. TNF- α , wzrasta ekspresja MPO i PR3 na powierzchni komórki, co wiąże się z ich prezentacją limfocytom T i B oraz uruchomieniem swoistej odpowiedzi immunologicznej [35,36].

Obecność NETs zaobserwowano między innymi u chorych z różnymi typami zapalenia naczyń oraz w kłębuszkowym zapaleniu nerek związanym z MPO-ANCA. Na modelach zwierzęcych dowiedziono, że NETs mogą inicjować autoimmunizację w AAV. Sangaletti i wsp. wykazali, że antygeny docelowe dla ANCA pochodzące z NETs mogą być transportowane do komórek dendrytycznych (DC). Badanie aktywowanych, prozapalnych granulocytów obojętnochłonnych inkubowanych z mieloidalnymi komórkami dendrytycznymi (mDC) wykazało, że neutrofile wyrzucające NETs tworzą stabilne połączenie z mDC. Natomiast, apoptotyczne PMNs czy nienaruszone neutrofile tylko przejściowo łączą się z mDC. Dodanie DNazy I do hodowli pozwoliło stwierdzić, że do pomyślnego transferu antygenów komórkom dendrytycznym niezbędny jest nienaruszony szkielet DNA/NETs. Trawienie nici DNA przez DNazę zablokowało przenoszenie MPO i PR3 do mDC [35,36].

Immunizacja myszy, przez dootrzewnowe wstrzyknięcie, różnymi wariantami komórek mDC (hodowanymi z neutrofilami po NETozie, apoptotycznymi, martwiczymi, w obecności DNazy lub bez) pozwoliła stwierdzić, że obciążone przez zawartość NETs komórki mDC indukują tworzenie autoprzeciwciał ANCA oraz przeciwciał przeciw ds-DNA. Wytwarzanie przeciwciał było związane z rozwojem autoimmunologicznego zapalenia naczyń wykrywanego w nerkach i płucach myszy [35,36].

Upośledzenie degradacji NETs może przyczyniać się do immunogenności zależnej od neutrofilów. Defekty w usuwaniu sieci neutrofilowych wiążą się z dłuższym utrzymywaniem się NETs *in vivo*, a tym samym mogą potęgować efekty immunogenne i patogenne. Nakazawa i wsp. wykazali, że zaburzona regulacja NETozy przyczynia się do rozwoju zapalenia naczyń związanych z MPO-ANCA wywołanych lekiem przeciwrtęciowym propylotiouracylem (PTU) u pacjentów z nadczynnością tarczycy. U ok. 30 % pacjentów przyjmujących ten lek wykrywa się przeciwciała MPO-ANCA, a u części z nich rozwija się zapalenie naczyń.



Ryc. 3. Hipotetyczny model produkcji przeciwciał ANCA w odpowiedzi na elementy NETs.

W celu stwierdzenia jak PTU wpływa na tworzenie się NETs przez pobudzone neutrofile oraz na degradację sieci przez DNAzę I, przeprowadzono badania *in vitro* oraz *in vivo* na szczurach. Wyniki badań dowiodły, że wytworzone w obecności leku sieci neutrofilowe wykazywały zaburzoną budowę i były prawie całkowicie odporne na trawienie przez DNAzę I. U szczurów poddanych immunizacji indukowanymi PTU granulocytami obojętnochnymi oraz u osobników, które lek dostały doustnie z dootrzewnowym podaniem PMA, wykryto obecność przeciwciał MPO-ANCA oraz wystąpienie zapalenia naczyń płuc i kłębuszkowego zapalenia nerek [34,37,38,39].

Sieci neutrofilowe mogą bezpośrednio stymulować układ odpornościowy poprzez kompleksy chromatyny i składnika LL37, pochodzącego z ziarnistości neutrofilów. Elementy te stymulują plazmacytoidalne komórki dendryczne i wydzielanie interferonu typu I. NETs wykazują zdolność do pobudzania limfocytów T poprzez zmniejszenie ich progu aktywacji i wydzielanie cytokin prozapalnych Th1, co również może sprzyjać autoreaktywności [40,41].

Dowody pochodzące z różnych badań *in vitro* oraz *in vivo* przemawiają za teorią zapętlenia się procesów zapalnych i autoimmunizacji. Pozakomórkowe elementy NETs mogą stanowić źródło autoantygenów i stymulować do produkcji autoantyciał, które z kolei same bądź w postaci kompleksów immunologicznych mogą indukować tworzenie sieci neutrofilowych [42]. Proces produkcji autoantyciał został schematycznie przedstawiony na rycinie 3.

Przeciwciała ANCA mogą pobudzać neutrofile do produkcji reaktywnych form tlenu i enzymów proteolitycznych. Aktywacja granulocytów obojętnochnych wywołana przez autoantyciała prowadzi również do ich wzmożonej adhezji i indukcji alternatywnego szklaku układu dopełniacza, co nasila rekrutację i pobudzenie większej liczby neutrofilów. Ponadto, przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofilów wykazują zdolność indukcji NETozy, a intensywność tego procesu jest większa podczas aktywnej choroby autoimmunologicznej [39,43,44].

Obecność ANCA niekoniecznie musi wiązać się z patogennym ich działaniem. Przeciwciała te mogą być częścią naturalnych przeciwciał, które są ważne dla utrzymania homeostazy. Uważa się, że ANCA pełnią podwójną rolę, oprócz indukowania formowania zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych mogą również pomagać w ich usuwaniu [45].

W wyniku trawienia zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych przez DNAzy powstają małe produkty, fragmenty NETs. Nitki sieci neutrofilowych zawierają antygeny, wobec których skierowane są przeciwciała ANCA. Pozostałe po rozpadzie fragmenty NETs ułatwiają własne usuwanie poprzez zainicjowanie wytwarzania naturalnych autoantyciał, a niektóre z nich mają specyficzność ANCA. Pod wpływem niesprzyjających bodźców powstają przeciwciała ANCA o patogennym działaniem, które reagują z neutrofilami i mogą nasilić proces NETozy [45].

Podsumowanie

Przeprowadzone dotychczas badania prezentują zarówno pozytywny jak i negatywny charakter zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych. Wchodzące w skład NETs komponenty, takie jak MPO i PR3, stanowią antygeny docelowe dla przeciwciał ANCA dlatego sieci mogą indukować powstawanie autoantyciał. Patogenność przeciwciał ANCA zależy od wielu czynników i nie wszystkie z nich wykazują niekorzystne działanie. Przełamanie wewnętrznej tolerancji i równowagi pomiędzy zachodzącymi procesami może prowadzić do błędnego koła, ponieważ przeciwciała przeciw cytoplazmie neutrofilów mogą aktywować granulocyty i pobudzać je do wytwarzania jeszcze większej ilości NETs. Analiza zagadnień związanych z regulacją tworzenia NETs i ich udziałem w chorobach autoimmunologicznych stanowi ważne ogniwo w badaniach układu immunologicznego. Dokładne poznanie mechanizmów regulujących formowanie NETs oraz produkcji autoantyciał przyczynić się może do wprowadzenia nowych strategii terapeutycznych w chorobach z autoagresji.

Piśmiennictwo

1. Janicki K. Hematologia Kliniczna. PZWL, Warszawa 1991.
2. Dmoszyńska A, Rodak T. Podstawy hematologii. Czelej, Lublin 2008.
3. Nowak WS, Skotnicki AB. Podstawy hematologii. Medycyna praktyczna, Kraków 2011.
4. Pietruczuk M. Podstawy hematologii w laboratoryjnej interpretacji wyników badań krwi obwodowej z analizatorów hematologicznych 3 i 5 diff. Diagnosta laboratoryjny 2016; 3 (44): 6-7.
5. Pijanowski Ł, Chadzińska M. Neutrofile - nieustraszeni pogromcy patogenów. Wszechświat 2012; 13: 4-6.
6. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nature Reviews Immunology 2013; 13 (3): 159-175.
7. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. Immunity 2010; 33 (5): 657-670.
8. Maśliński W, Kontny E. Podstawy immunologii dla reumatologów. NIGRiR, Warszawa 2015.
9. Gołąb J, Jakóbsiak M, Lasek W, Stokłosa T. Immunologia. Nowe wydanie. PWN, Warszawa 2017.
10. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann Ch i wsp. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 2004; 303: 1532-1535.
11. Yang H, Biermann MH, Brauner JM i wsp. New insights into neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in inflammation. Front Immunol 2016; 7: 302.
12. Santocki M, Kolaczowska E. On Neutrophil Extracellular Trap (NET) Removal: What We Know Thus Far and Why So Little. Cells 2020; 9 (9): 2079.
13. Csomós K, Kristóf E, Jakob B i wsp. Protein cross-linking by chlorinated polyamines and transglutamylation stabilizes neutrophil extracellular traps. Cell Death Dis 2016; 7: 1-14.
14. Miyata T, Fan X. A second hit for TMA. Blood 2012; 120 (6): 1152-1154.
15. Yipp GG, Kubes P. NETosis: how vital is it? Blood 2013; 122 (16): 2784-2794.
16. de Buhr N, von Köckritz-Blickwede M. How Neutrophil Extracellular Traps Become Visible. J Immunol Res 2016; 2016: 4604-4713.
17. Boeltz S, Amini P, Anders HJ i wsp. To NET or not to NET: current opinions and state of the science regarding the formation of neutrophil extracellular traps. Cell Death Differ 2019; 26: 395-408.
18. Remijsen Q, Vanden Berghe T, Wirawan E i wsp. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. Cell Res 2011; 21: 290-304.
19. Fuchs TA, Abed U, Goosmann Ch i wsp. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. J Cell Biol 2007; 176: 231-241.
20. Yousefi S, Mihalache C, Kozłowski E i wsp. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. Cell Death and Differentiation 2009; 16 (11): 1438-1444.
21. Bossuyt X, Cohen Tervaert JW, Arimura Y i wsp. Revised 2017 international consensus on testing of ANCA in granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis. Nature Reviews Rheumatology 2017; 13 (11): 683-692.
22. Davies DJ, Moran JE, Niall JF i wsp. Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? Br Med J Clin Res Ed 1982; 285: 6342-6606.
23. Drooger JC, Dees A, Swaak AJG. ANCA-Positive Patients: The Influence of PR3 and MPO Antibodies on Survival Rate and The Association with Clinical and Laboratory Characteristics. Open Rheumatol J 2009; 3: 14-17.
24. Jennette JCh, Falk R, Bacon A i wsp. 2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. Arthritis Rheum 2013; 65: 1-11.
25. Wiatr E, Gawryluk D. Pierwotne systemowe zapalenia naczyń związane z przeciwciałami przeciwcytoplazmatycznymi (ANCA) - rekomendacje diagnostyczne i lecznicze. Pneumonol Alergol Pol 2013; 81: 479-491.
26. McKinney EF, Willcocks LC, Broecker V i wsp. The immunopathology of ANCA-associated vasculitis, Semin Immunopathol 2014; 36 (4): 461-478.
27. Hunter RW, Welsh N, Farrah TE i wsp. ANCA associated vasculitis. BMJ 2020; 369: 1070.
28. Alba MA, Jennette JC, Falk RJ. Pathogenesis of ANCA-Associated Pulmonary Vasculitis. Semin Respir Crit Care Med 2018; 39 (4): 413-424.
29. Pendergraft WFIII, Preston GA, Shah RR i wsp. Autoimmunity is triggered by cPR-3(105-201), a protein complementary to human autoantigen proteinase-3. Nat Med 2004; 1: 72-79.
30. Merkel PA. Drug-induced vasculitis. Rheum Dis Clin North Am 2001; 27 (04): 849-862.
31. Beaudreuil S, Lasfargues G, Lauériere L i wsp. Occupational exposure in ANCA-positive patients: a case-control study. Kidney Int 2005; 67 (05): 1961-1966.
32. Merkel PA, Xie G, Monach PA i wsp. Vasculitis Clinical Research Consortium. Identification of functional and expression polymorphisms associated with risk for antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. Arthritis Rheumatol 2017; 69 (05): 1054-1066.
33. Harper L, Cockwell P, Adu D i wsp. Neutrophil priming and apoptosis in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. Kidney Int 2001; 59 (5): 1729-1738.
34. Kusunoki Y, Nakazawa D, Shida H i wsp. Peptidylarginine Deiminase Inhibitor Suppresses Neutrophil Extracellular Trap Formation and MPO-ANCA Production. Front Immunol 2016; 7: 227.
35. O'Sullivan KM, Holdsworth SR. Neutrophil Extracellular Traps: A Potential Therapeutic Target in MPO-ANCA Associated Vasculitis? Front Immunol 2021; 12.
36. Sangaletti S, Tripodo C, Chiodoni C i wsp. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. Blood 2012; 120: 3007-3018.
37. Nakazawa D, Tomaru U, Suzuki A i wsp. Abnormal conformation and impaired degradation of propylthiouracil-induced neutrophil extracellular traps: implications of disordered neutrophil extracellular traps in a rat model of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. Arthritis Rheum 2012; 64 (11): 3779-3787.
38. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps (NETs): Double-edged swords of innate immunity. J Immunol 2012; 189 (6): 2689-2695.
39. Nakazawa D, Shida H, Tomaru U i wsp. Enhanced formation and disordered regulation of NETs in myeloperoxidase-ANCA-associated microscopic polyangiitis. J Am Soc Nephrol 2014; 25 (5): 990-997.
40. Radic M, Kaplan MJ. Jumbled NETs promote vasculitis. Arthritis Rheum 2012; 64 (12): 3498-3501.
41. Tillack K, Breiden P, Martin R i wsp. T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. J Immunol 2012; 188: 3150-3159.
42. Fousert E, Toes R, Desai J. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Take the Central Stage in Driving Autoimmune Responses. Cells 2020; 9 (4): 915.
43. Xiao H, Schreiber A, Heeringa P i wsp. Alternative Complement Pathway in the Pathogenesis of Disease Mediated by Anti-Neutrophil Cytoplasmic Autoantibodies. Am J Pathol 2007; 170 (1): 52-64.
44. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U i wsp. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. Nat Med 2009; 15 (6): 623-625.
45. Soderberg D, Kurz T, Motamedi A i wsp. Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the circulation of patients with small vessel vasculitis, but an inverse correlation to anti-neutrophil cytoplasmic antibodies during remission. Rheumatology (Oxford) 2015; 54 (11): 2085-2094.