

MICHAŁ SANTOCKI, ELŻBIETA KOŁACZKOWSKA

*Zakład Immunologii Ewolucyjnej  
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych  
Uniwersytet Jagielloński  
Gronostajowa 9, 30-387 Kraków  
E-mail: ela.kolaczowska@uj.edu.pl*

## WYRZUT ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH SIECI NEUTROFILOWYCH (NET) PRZEZ NEUTROFILE I CO DALEJ? KONSEKWENCJE TWORZENIA I NIEPRAWIDŁOWEGO USUWANIA NET

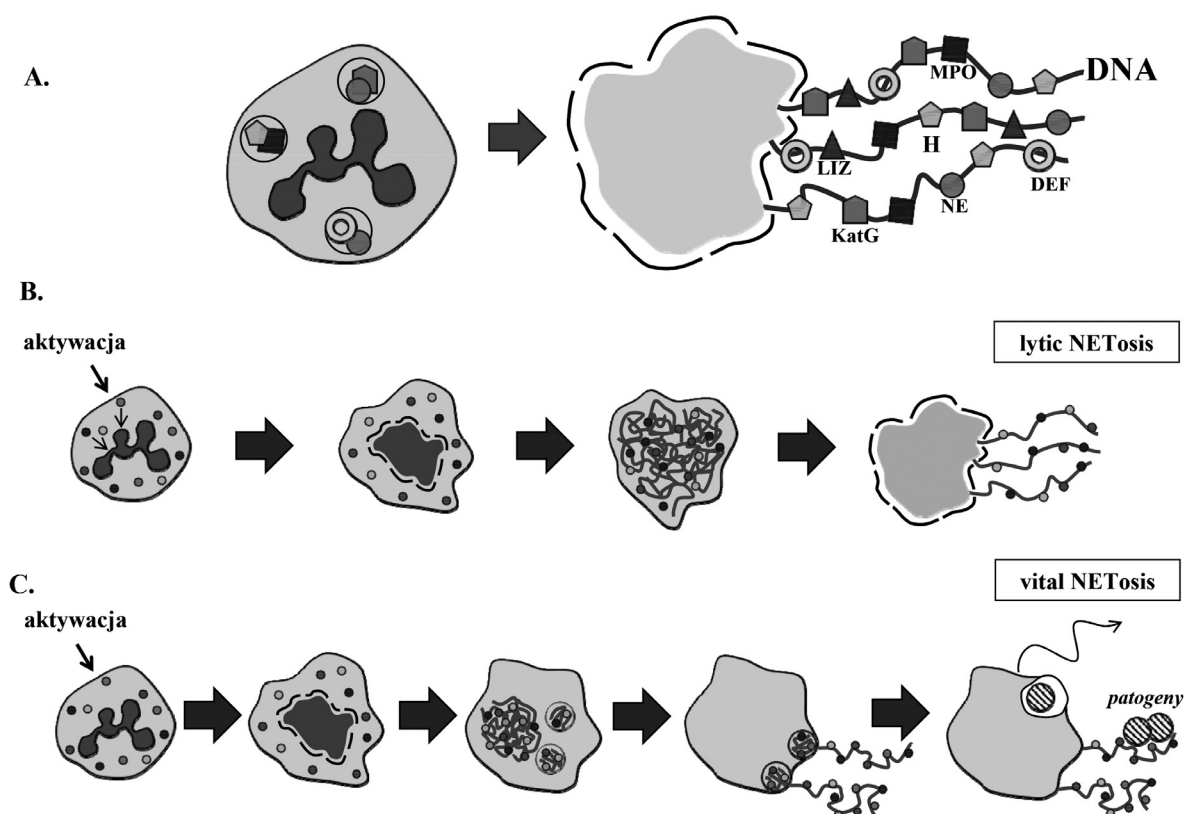
### WSTĘP

Neutrofile stanowią pierwszą linię obrony organizmu przed patogenami (KOLACZKOWSKA i KUBES 2013). Komórki te są produkowane w szpiku kostnym i sukcesywnie uwalniane do układu krążenia, jako w pełni zróżnicowane neutrofile wyposażone w liczne ziarnistości ulokowane w cytoplazmie (BORREGAARD 2010). Krążące we krwi neutrofile mogą być następnie rekrutowane w miejsce zakażenia lub sterylnej zapalenia, w odpowiedzi na czynniki zapalne (KOLACZKOWSKA i KUBES 2013, NAUSEEF i BORREGAARD 2014). Spośród leukocytów obecnych w krążeniu, neutrofile jako pierwsze migrują do miejsca zakażenia, w którym rozpoczynają aktywną eliminację patogenów, korzystając z szerokiego zakresu „narzędzi”, do których można zaliczyć fagocytozę, degranulację i wyrzut zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (ang. neutrophil extracellular traps, NET). Dwa pierwsze mechanizmy zostały opisane bardziej szczegółowo w pracy CICHON i KOŁACZKOWSKIEJ w tym zeszycie KOSMOSU.

Rolą NET jest łapanie, unieruchomienie, ułatwienie fagocytozy, a w niektórych sytuacjach także zabijanie uwieczonych mikroorganizmów (BRINKMANN i współaut. 2004, KOLACZKOWSKA i KUBES 2013, KOLACZKOWSKA i współaut. 2015). Neutrofilowe sieci zewnątrzkomórkowe, oryginalnie odkryte i opisane przez zespół Arturo Zychlinskiego z Instytutu Maxa Plancka w Berlinie (Niemcy) w 2004 r., stanowią nowy, nieznan dotych-

czas mechanizm, poprzez który neutrofile mogą walczyć z patogenami. W trakcie tego procesu, aktywowane neutrofile uwalniają na zewnątrz swój DNA w postaci włókien chromatyny, do których przyłączone są histony i białka pierwotnie znajdujące się w ziarnistościach obecnych w cytoplazmie neutrofilu (BRINKMANN i współaut. 2004) (Ryc. 1A). Chociaż w swojej oryginalnej pracy poświęconej odkryciu i charakterystyce NET, zespół Arturo Zychlinskiego stwierdził, że wyrzucające je neutrofile pozostają przy życiu, kolejne prace tego zespołu donosiły o śmierci neutrofila w czasie tego procesu, który został z czasem nazwany NETozą (ang. NETosis) (STEINBERG i GRINSTEIN 2007) (Ryc. 1B). Dalsze badania wykazały jednak, że tworzenie NET może zachodzić poprzez szybki, niepowodujący przerwania błony i w konsekwencji śmierci neutrofila, wyrzut sieci przez system pęcherzyków (PILSCZEK i współaut. 2010). Zjawisko to potwierdzono następnie przy pomocy mikroskopii przyżyciowej w badaniach, które pokazały, że po wyrzuceniu NET neutrofile dalej fagocytują bakterie i przemieszczają się w ich kierunku (YIPP i KUBES 2016) (Ryc. 1C). Taki typ śmierci określono jako „przyżyciową NETozę” (ang. vital NETosis), przeciwstawiając ją „litycznej NETozie” (ang. lytic NETosis) kończącej się przerwaniem błony komórkowej i śmiercią neutrofila (Ryc. 1B vs 1C). Obecnie odchodzi się jednak od tej nomenklatury, postulując zaprzestanie stosowania terminu NEToza.

\*Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu 2014/15/B/NZ6/02519 (Opus 8).



Ryc. 1. Budowa sieci NET oraz dwa udokumentowane mechanizmy powstania sieci: przyżyciowy (vital NETosis) i związany ze śmiercią neutrofila (lytic NETosis).

(A) Szkieletem każdej sieci są nici zdekondensowanego DNA, do których przyłączone są białka i enzymy uwolnione z ziarnistości neutrofilowych. Są to m.in. elastaza neutrofilowa (NE), mieloperoksydaza (MPO), histony (H), katepsyna G (KatG), lizozym (LIZ) czy  $\alpha$ -defensyny (DEF). Zgodnie z danymi literaturowymi, wyrzut NET z neutrofila może się wiązać ze śmiercią komórki (B), ale także nie musi prowadzić do śmierci neutrofila (C). W obu przypadkach dochodzi do strawienia otoczki jądrowej i błon otaczających ziarnistości, w konsekwencji czego dochodzi do łączenia się DNA z białkami pochodzącymi z ziarnistości. (B) W przebiegu NETozy litycznej sieci uwalniane są z neutrofila poprzez rozerwanie błony komórkowej. (C) W przypadku NETozy przyżyciowej NET są uwalniane przez system pęcherzyków wydzielniczych. Mechanizm ten nie wiąże się z uszkodzeniem błony komórkowej dzięki czemu neutrofil żyje i może dalej pełnić swoje funkcje: fagocytować i aktywnie się przemieszczać.

NET niewątpliwie odgrywają ważną rolę w walce z infekcją, co udowodniono eksperymentalnie zarówno w badaniach na myszach, jak również badając neutrofile człowieka. Myszy niezdolne do wytworzenia neutrofilowych sieci zewnątrzkomórkowych są bowiem bardziej podatne na infekcje bakteryjne (Li i współaut. 2010), natomiast pacjenci, których neutrofile nie wytwarzają NET cierpią na zagrażające życiu, nawracające infekcje, np. grzybicze (BIANCHI i współaut. 2009). Po początkowym skupieniu się na niewątpliwie pozytywnych stronach wyrzutu NET przez neutrofile, z czasem zaczęto zauważać skutki uboczne ich tworzenia, wynikające m.in. z udziału sieci w wielu chorobach autoimmunizacyjnych, w tym w reumatoidalnym zapaleniu stawów (RZS) (KHANDPUR i współaut. 2013, WRIGHT i współaut. 2014), toczeniu rumieniowatym układowym (BOSCH 2011, LANDE i współaut.

2011, YU i SU 2013), układowym zapaleniu małych naczyń (KESSENBROCK i współaut. 2009), a także w patologiiach związanych z krzepnięciem krwi (FUCHS i współaut. 2010, MARTINOD i współaut. 2013) oraz w przebiegu sepsy (CLARK i współaut. 2007, KOŁACZKOWSKA i współaut. 2015, CZAİKOSKI i współaut. 2016). Co więcej, jak wskazują najnowsze doniesienia, NET biorą także udział w patogenezie łuszczyca (HU i współaut. 2016, SKRZECZYŃSKA-MONCZNIK i współaut. 2017).

#### BUDOWA NET ORAZ PROCESY PROWADZĄCE DO ICH POWSTANIA

Neutrofilowe sieci zewnątrzkomórkowe to struktury, na których rdzeń składają się gładkie włókna chromatyny o średnicy 15-17 nm, w obrębie których występują kuliste domeny białkowe o średnicy 25 nm. Agregują one w większe nici, których średnica może

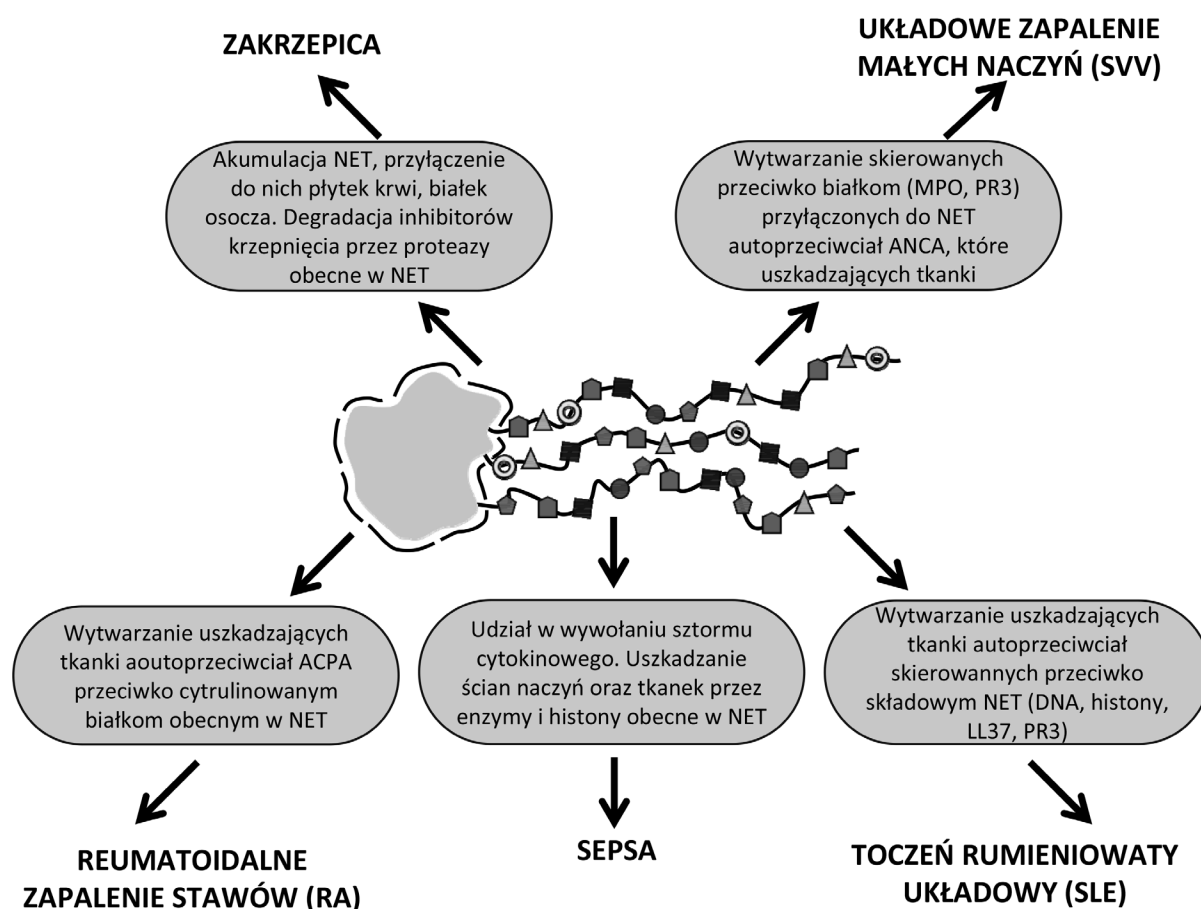
osiągać nawet 50 nm (BRINKMANN i współaut. 2004, BRINKMANN i ZYCHLINSKY 2007). W swojej oryginalnej pracy zespół Zychlinskiego, posługując się metodą immunofluorescencji wykazał, że w obrębie włókien chromatyny wyrzuconej przez neutrofile obecne są także białka pierwotnie znajdujące się w ziarnistościach neutrofilowych. Zidentyfikowano i zwizualizowano w ten sposób białka ziarnistości pierwszorzędowych takie jak: elastaza neutrofilowa (ang. neutrophil elastase, NE), katepsyna G i mieloperoksydaza (ang. myeloperoxidase, MPO), a także ziarnistości drugorzędowych i trzeciorzędowych jak: laktoferyna i żelatynaza (BRINKMANN i współaut. 2004). Dalsze analizy, przy użyciu spektrometrii mas, wykazały obecność w obrębie neutrofilowych sieci białek, które w niestymulowanych neutrofilach znajdują się w jądrze, ziarnistościach i cytoplazmie. Spośród białek jądrowych potwierdzono obecność wszystkich czterech podtypów białek histonowych, natomiast wśród białek występujących w ziarnistościach, oprócz znanych już wcześniej, wykazano obecność nieznanych dotąd składowych NET jak: azurocydyna, lizozym i  $\alpha$ -defensyny (URBAN i współaut. 2009) (Ryc. 1A). Analiza ilościowa wykazała, że białkami najliczniej występującymi w obrębie NET są białka histonowe, które stanowią 70% wszystkich protein w obrębie sieci (URBAN i współaut. 2009).

Mechanizmy prowadzące do wyrzutu NET przez silnie aktywowane neutrofile są ciągle przedmiotem badań zarówno na poziomie komórkowym, jak i molekularnym. Jednym z wyzwań związanych z badaniami nad NET jest ich obserwacja *in vivo* (*in situ* w naczyniach krwionośnych lub tkankach objętych zapaleniem), dlatego też zdecydowana większość wyników pochodzi z badań *in vitro*. Ten typ badań nie zawsze poprawnie odzwierciedla warunki panujące w żywym organizmie (kompleksowość warunków środowiskowych, obecność różnych typów komórek i tkanek) i wydaje się mieć szczególnie krytyczne znaczenie w badaniach nad NET. Wielokrotnie bowiem wyniki otrzymane *in vitro* nie były potwierdzane w układach *in vivo*. Na przykład, liczne badania *in vitro* wskazują na zależność wyrzutu NET od wytworzenia reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS), wynikającego z aktywacji kompleksu oksydazy NADPH (FUCHS i współaut. 2007, ROCHAEL i współaut. 2015). Jednak badania *in vivo* na myszach transgenicznego typu nokaut, nieprodukujących niektórych podjednostek oksydazy NADPH, nie potwierdziły roli ROS w wyrzucie NET (KOLACZKOWSKA i współaut. 2015). Mechanizmem, który został potwierdzony zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*, jest proces

cytrulinacji histonów. Proces ten jest zależny od aktywacji deiminazy peptydyloargininy 4 (ang. peptidylarginine deiminase 4, PAD4), enzymu którego główną funkcją jest modyfikacja histonów, polegająca na ich cytrulinacji, czyli zastąpieniu w resztach histonów H2A, H3 i H4 aminokwasu argininy przez cytrulinę (MAKRYGIANNAKIS i współaut. 2006, LI i współaut. 2010). Proces ten wiąże się ze zmianą ładunku pozytywnie naładowanej argininy, na pozbawioną ładunku cytrulinę, co w efekcie prowadzi do dekondensacji DNA w obrębie jądra komórkowego (WANG i współaut. 2009). Dodatkowo postuluje się, że w proces tworzenia NET zaangażowana jest także elastaza neutrofilowa. Zatem proteaza ta jest nie tylko składową sieci, ale również uczestniczy w ich tworzeniu. Wyniki wskazują bowiem, że NE przemieszcza się z ziarnistości azurofilnych neutrofila do jądra komórkowego, gdzie aktywnie włącza się w dekondensację chromatyny, tnąc histony łącznikowe H1 (PAPAYANNOPOULOS i współaut. 2010). Rola NE w tworzeniu NET została potwierdzona zarówno na izolowanych neutrofilach, jak i na myszach laboratoryjnych. Stwierdzono na przykład, że u myszy nokaut nieprodukujących tego enzymu, tworzenie NET jest bardzo osłabione (KOLACZKOWSKA i współaut. 2015). Jednak istnieją także doniesienia wskazujące na to, że myszy nieprodukujące NE mogą wyrzucać sieci (MARTINOD i współaut. 2016). Więcej informacji na temat mechanizmów tworzenia NET, w tym znaczenia reaktywnych form tlenu, elastazy neutrofilowej i mieloperoksydazy przedstawiono w artykule PIJANOWSKI i współaut. w tym zeszycie KOSMOSU.

#### ZŁE STRONY NEUTROFILOWYCH SIECI ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH

Oprócz niewątpliwych zalet tworzenia NET, w tym lepszej kontroli zwłaszcza początkowej fazy infekcji, zaleganie sieci w tkankach i naczyniach krwionośnych, wynikające z nich nieprawidłowego usuwania, powoduje uszkodzenia tkanek własnych (KOLACZKOWSKA i KUBES 2013, YIPP i KUBES 2016). Z drugiej strony, obecność w przestrzeni pozakomórkowej białek, które w stanie homeostazy tam nie występują, może powodować aktywację układu odpornościowego. Leukocyty odpowiedzi wrodzonej, w tym makrofagi i komórki dendrytyczne, mogą bowiem rozpoznawać takie struktury jako wzorce molekularne związane z zagrożeniem/uszkodzeniem (ang. danger/damage associated molecular patterns, DAMP), prezentować je limfocytom Th, w tym Th2, i indukować produkcję przeciwciał przez plazmocyty (zaktywowane limfocyty B) (CHEN i



Ryc. 2. Wpływ NET na wywołanie i/lub przebieg niektórych chorób.

ACPA, przeciwciała przeciwko cytrulinowanym białkom; ANCA, przeciwciała przeciwko białkom obecnym w ziarnistościach neutrofilii; LL37, katelicydyna, peptyd bakterioobójczy; MPO, mieloperoksydaza; PR3, proteaza serynowa 3; RA, reumatoidalne zapalenie stawów; SLE, toczeń rumieniowaty układowy; SVV, układowe zapalenie małych naczyń.

NUÑEZ 2010). Istnieje wiele chorób, których przyczyna lub przebieg zostały powiązane z nadmiernym lub przewlekłym tworzeniem NET, albo ich nieprawidłowym usuwaniem (Ryc. 2). Przykładowo, za jedną z przyczyn rozwoju układowego zapalenia naczyń małych (ang. small-vessel vasculitis, SVV) uważa się tworzenie autoopreciwciał określanych skrótem ANCA (ang. anti-neutrophil cytoplasmic antibodies), skierowanych przeciwko białkom obecnym w ziarnistościach neutrofilii, wykazujących duże powinowactwo zwłaszcza w stosunku do MPO i proteinazy 3 (PR3) (YOSHIDA i współaut. 2013, O'SULLIVAN i współaut. 2015). SVV to nawracająca choroba autoimmunizacyjna, która prowadzi do nekrotycznych stanów zapalnych małych naczyń krwionośnych i kapilar, powodując uszkodzenia zwłaszcza w nerkach, płucach, skórze i nerwach obwodowych. Co ciekawe, przeciwciała ANCA mogą oddziaływać na neutrofile, aktywując je do produkcji ROS

oraz licznych proteaz, i w ten sposób prowadzą do zmian zapalnych w naczyniach krwionośnych (CHEN i KALLENBERG 2009). Pierwsze przesłanki łączące tworzenie NET ze stanami patologicznymi odnotował w 2009 r. zespół Kessenbrocka, który wykazał, że MPO i PR3 są składnikami NET obecnych w naczyniach chorych na SVV oraz jednocześnie, że przeciwciała ANCA (konkretnie przeciwciała anty-PR3) mogą wywoływać wyrzut NET przez neutrofile na zasadzie sprzężenia zwrotnego dodatniego: więcej NET-więcej ANCA-więcej NET, tworzonych przez następną falę neutrofilii (KESSENBROCK i współaut. 2009). Jednocześnie, kompleksy DNA-MPO, będące częścią NET, są wykrywane w krążeniu chorych na SVV, a ich poziom koreluje ze stopniem zaawansowania choroby. Ponadto, zewnątrzkomórkowy DNA z przyłączonymi histonami, MPO i PR3, wykryto w biopsjach pobranych z nerek pacjentów z SVV, co wskazuje, że tworzenie NET ma miejsce

w aktywnej formie tej choroby (KESSENBROCK i współaut. 2009).

Powstawanie przeciwciał skierowanych przeciwko składowym NET jest rowniez obserwowane w przebiegu choroby o nazwie toczen rumieniowaty układowy (ang. systemic lupus erythematosus, SLE) (SMITH i KAPLAN 2015). SLE to złozona choroba autoimmunizacyjna o zronnicowanych objawach, obejmujących łagodne wysypki skorne, az do zagrażających życiu objawów wielonarządowych (CRISPN i współaut. 2010). W efekcie jednoczesnego lub następującego po sobie działania czynników genetycznych (np. braku pojedynczych genów układu dopełniacza), srodowiskowych, hormonalnych i epigenetycznych, dochodzi do wytworzenia autoprzeciwciał, kompleksów immunologicznych, autoreaktywnych limfocytów T i cytokin prozapalnych, powodujących rozległe uszkodzenia takich tkanek i narządów jak: skora, nerki, płuca, mozg czy serce (TSOKOS 2011). Choc w przebiegu SLE liczba neutrofilów spada, a komórki te wykazują zaburzona fagocytoze i nieprawidłową aktywnoc oksydacyjną, to jednak generują więcej NET niz neutrofile osób zdrowych (LANDE i współaut. 2011, SMITH i KAPLAN 2015). Konsekwentnie, jedną z cech charakterystycznych tej choroby jest wysokie miano autoprzeciwciał skierowanych przeciwko składowym NET: DNA, białkom histonowym, MPO, PR3, LL37 (antybakteryjny peptyd uwalniany pod wplywem PR3 z katelicydyny), defensynom, laktoferynie czy katepsynie G (FAUZI i współaut. 2004, LANDE i współaut. 2011, YU i SU 2013). Powstające autoprzeciwciała nie są wystarczająco szybko usuwane i akumulują sie w tkankach w postaci kompleksów immunologicznych, inicjując reakcje cytotoksyczne (MANSON i współaut. 2009). Dodatkowo, niektóre przeciwciała anty-DNA wiz sie z receptorami NMDA (receptorami N-metylo-D-asparaginowymi dla glutamianu) znajdującymi sie w mozgu, a po przekroczeniu bariery krew-mozg wiz sie z komórkami nerwowymi uszkadzając je (KOWAL i współaut. 2006). Ponadto, u chorych na SLE wykazano obecnoc przeciwciał skierowanych przeciwko fosfolipidom i glikoproteinom, a ich występowanie związane jest z powstawaniem zakrzepów (RUIZ-IRASTORZA i współaut. 2010).

Produkcja przeciwciał skierowanych przeciwko elementom NET jest rowniez charakterystyczna dla reumatoidalnego zapalenia stawów, choc w tym przypadku, charakterystyczne są zwłászcza przeciwciała skierowane przeciwko białkom cytrulinowanym. Reumatoidalne zapalenie stawów (ang. rheumatoid arthritis, RA) to przewlekła, ogólnoustrojowa choroba autoimmunizacyjna, której konse-

kwencj jest zniszczenie chrząstki stawowej (VIATTE i współaut. 2013). Zapalenie i zniszczenie stawów jest wynikiem napływu do przestrzeni maziowej stawu leukocytów takich jak: limfocyty, makrofagi i neutrofile, które wydzielają prozapalne mediatory: cytokiny, chemokiny i prostaglandyny (WRIGHT i współaut. 2014). Wsród komórek obecnych w mazi stawowej najliczniejszą grup stanową neutrofile, które przyczyniają sie do degradacji chrząstki, wydzielając proteazy takie jak: metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 8 (MMP-8), MMP-9, NE, katepsyna G i PR3 (MURPHY i NAGASE 2008). Ryzyko wystąpienia RA u osób obcizonych genetycznie ulega znaczącemu zwiększeniu przez czynniki srodowiskowe, które powodują modyfikacje białek gospodarza, w tym ich cytrulinacje, co w efekcie prowadzi do utraty tolerancji immunologicznej w stosunku do tych wsnych białek (CHEMIN i współaut. 2016). Cytrulinacja białek prowadzi do wytworzenia autoprzeciwciał skierowanych przeciwko tym nowopowstałym autoantygenom, a takie przeciwciała są określane skrótem ACPA (ang. anti-citrullinated protein antibodies) (PRATESI i współaut. 2014). Jednymi z najczęściej występujących cytrulinowanych autoantygenów są: wimentyna, antytrombina,  $\alpha$ -enolaza, fibrynogen i histony, które są elementami NET (KHANDPUR i współaut. 2013). Jak juz wspomniano, cytrulinacja tych ostatnich przez enzym PAD4 jest niezbędnym etapem w trakcie formowania sieci NET (WANG i współaut. 2009), a w przebiegu RA sieci są zarówno ųródłem autoantygenów, jak i celem dla autoprzeciwciał ACPA (CHOWDHURY i współaut. 2014). Wykazano, ųe zwiększona zdolnoc neutrofilów osób chorych na RA do wyrzutu NET istotnie koreluje z wysokim poziomem ACPA (KHANDPUR i współaut. 2013). Rowniez w tym przypadku przeciwciała ACPA są w stanie pobudzac powstawanie sieci, a kontakt NET z komórkami błony stawowej aktywuje te drugie do produkcji czynników zapalnych (KHANDPUR i współaut. 2013).

NET są także zaangażowane w tworzenie zakrzepic, w tym zakrzepicy ųył głbokich (ang. deep vein thrombosis, DVT). Krzepnięcie krwi to proces fizjologiczny, który może byc przykładem tego jak intensywnoc tworzenia NET determinuje, czy będą one odgrywają pozytywną czy negatywną rolę w organizmie. Zakrzepy krwi tętnicznej są często wywoływane uszkodzeniem sródbłnka, natomiast do zakrzepów ųylnych dochodzi zazwyczaj, gdy przepływ krwi jest zmniejszony przez kilka godzin (ESMON 2009). W obu przypadkach neutrofile napływają do miejsca wytworzenia sie skrzepu i ściśle przylegają do sródbłnka (KAMBAS i współaut. 2012).

Elementem krwi aktywnie uczestniczącym w tworzeniu skrzepu są płytki krwi, które po aktywacji wchodzą w interakcję z neutrofilami przylegającymi do ścian naczyń. Wiązanie płytek krwi do neutrofilów może aktywować te drugie i w efekcie prowadzić do wyrzutu NET (CLARK i współaut. 2007). Następnie płytki krwi zaczynają przylegać do samych NET, tworząc najpierw małe agregaty, które z czasem mogą się powiększać. W dalszej kolejności do sieci przylegają także erythrocyty, razem tworząc tzw. czerwony skrzep (FUCHS i współaut. 2010, BRILL i współaut. 2012). Oprócz płytek krwi i czerwonych krwinek, sieci NET są także miejscem przyczepu dla białek osocza takich jak: czynnik Von Willebranda (ang. von Willebrand factor, VWF), fibronektyna i fibrynogen, które sprzyjają tworzeniu skrzepu oraz stabilizują go (FUCHS i współaut. 2010). Analizy immunocytochemiczne wykazały, że w bliskim sąsiedztwie DNA i VWF, w obrębie skrzepów żylnych w przebiegu DVT, znajdują się także cytrulinowane histony H3, co potwierdza udział neutrofilowych sieci zewnątrzkomórkowych w tworzeniu skrzepów (BRILL i współaut. 2012). Spośród składowych NET biorących udział w tworzeniu skrzepu, ważną rolę odgrywają także proteazy serynowe: elastaza neutrofilowa (NE) i katepsyna G, które potrafią degradować inhibitory krzepnięcia. Wykazano także, że u myszy pozbawionych tych białek, odkładanie fibryny i tworzenie skrzepu jest zredukowane, podobnie jak to jest obserwowane po zastosowaniu przeciwciał przeciwko kompleksowi histony-DNA (MASSBERG i współaut. 2010). Dotychczas potwierdzono rolę wszystkich elementów NET w procesie tworzenia (mikro- i makro-) zakrzepów (GOULD i współaut. 2015). Nadmiar neutrofilowych sieci zewnątrzkomórkowych powoduje nadmierną koagulację, która, zatrzymując dopływ krwi do narządów, może prowadzić do ich niedokrwienia (BRINKMANN i ZYCHLINSKY 2012). Zjawisko to jest także obserwowane w przebiegu sepsy (posocznicy), zagrażającej życiu ogólnoustrojowej reakcji zapalnej. Sepsa zazwyczaj jest konsekwencją zakażenia krwi, towarzyszy jej niewydolność wielonarządowa, może prowadzić do wstrząsu septycznego i ostatecznie śmierci, nawet w 40% przypadków (CHANG i współaut. 2010). Szybkie rozpoznanie sepsy, podawanie antybiotyków i utrzymanie równowagi elektrolitów (kierunkowe nawodnienie) zwiększa szanse przeżycia, jednakże pacjenci, którzy przeżyją ciężką sepsę często zmagają się z trwałymi uszkodzeniami narządów, zaburzeniami funkcji poznawczych i niepełnosprawnością (IWASHYNA i współaut. 2011). Sepsa jest konsekwencją infekcji o różnorodnym podłożu (bakteryjnym, wiru-

sowym, grzybiczym) i prowadzi do złożonej odpowiedzi immunologicznej organizmu, w wyniku której dochodzi do ogólnoustrojowej aktywacji leukocytów, najliczniej reprezentowanych przez neutrofile (HAZELDINE i współaut. 2014). Prace badawcze na myszach wykazały, że w czasie sepsy zachodzi intensywny napływ neutrofilów do takich organów jak: wątroba, płuca czy nerki, w których dodatkowo produkowane są liczne NET (LUO i współaut. 2014, KOŁACZKOWSKA i współaut. 2015, CZAİKOSKI i współaut. 2016). Na pierwszych etapach sepsy, ważną rolą NET w tych narządach jest wyłapywanie bakterii i zapobieganie ich rozprzestrzenianiu. Posługując się metodą mikroskopii *in vivo*, w trakcie której obrazowano sinusoidy, czyli naczynia krwionośne wątroby, MCDONALD i współaut. (2012) wykazali, że przylegające do ścian naczyń neutrofile wyrzucają sieci, które doskonale wyłapują z krążenia podane wcześniej dożylnie bakterie *E. coli*. Zasadniczo, wyłapywanie bakterii z krwi jest funkcją osiadłych w sinusoidach makrofagów, czyli komórek Browicza-Kupffera, jednak w przypadku sepsy funkcję tę przejmują częściowo NET. Są one w stanie wyłapać cztery razy więcej bakterii niż komórki Browicza-Kupffera (MCDONALD i współaut. 2012). Pomimo pożądanym funkcji obronnych związanych z tworzeniem NET, struktury te przyczyniają się także do rozwoju patologii towarzyszącej sepsie. Jednym z charakterystycznych zjawisk towarzyszących posocznicy jest tzw. sztorm cytokinowy, polegający na produkcji bardzo dużych ilości cytokin i ich wyrzucie do krwi (KOŁACZKOWSKA i KUBES 2013). Udowodniono, że podanie DNazy rozkładającej DNA sieci, znacząco obniża produkcję cytokin (LUO i współaut. 2014). Wykazano także korelację pomiędzy wysokim poziomem wolnego DNA lub kompleksów DNA-MPO pochodzących z NET a wysokim poziomem markerów świadczących o uszkodzeniach narządów (wątroby, nerek, serca, płuc) oraz śródbłonna. Zjawisko to obserwowano zarówno u myszy, jak i pacjentów z sepsą (CZAİKOSKI i współaut. 2016). NET są silnie powiązane z uszkodzeniem śródbłonna oraz niewydolnością narządów, typowymi zjawiskami w patologii sepsy. Jak wykazano w badaniach *in vitro*, aktywowany śródbłonek może pobudzać wyrzut sieci przez neutrofile, co powoduje uszkodzenie jego samego (GUPTA i współaut. 2010). Chcąc poznać mechanizmy powstawania i degradacji NET w czasie posocznicy, KOŁACZKOWSKA i współaut. (2015), wykorzystując technikę mikroskopii przyżyciowej, zbadali rolę NET w czasie sepsy wywołanej eksperymentalnie u myszy poprzez podanie bakterii *Staphylococcus aureus*. Koncentrując swe badania na wątro-

bie, organie w którym skupiała się największa liczba bakterii, i który uległ największemu zniszczeniu, zaobserwowano zwiększony napływ neutrofilów i silny wyrzut NET. Okazało się, że NET były obecne w naczyniach wątroby jeszcze przez wiele godzin od ich wyrzutu i eliminacji bakterii krążących we krwi. Szczegółowe badania ujawniły, że to zalegające w naczyniach NET, a głównie przyłączone do nich NE, powodują uszkodzenia śródbłonka naczyniowego i hepatocytów (KOLACZKOWSKA i współaut. 2015).

### FIZJOLOGICZNE MECHANIZMY USUWANIA NET

Powyższe przykłady wskazują na bezpośredni wpływ nadmiernego tworzenia NET lub ich nieprawidłowego usuwania na rozwój chorób o różnorodnym podłożu, jednoznacznie dowodząc, że tworzenie NET może być związane z nasiloną odpowiedzią immunologiczną. Istotnie, przeciwciała skierowane przeciwko DNA, histonom czy białkom ziarnistości neutrofilowych są cechą charakterystyczną wielu schorzeń autoimmunizacyjnych (MANSON i współaut. 2009, CRISPÍN i współaut. 2010, PRATESI i współaut. 2014), wskazując sieci jako źródło autoantygenów (HAKKIM i współaut. 2010).

W tym świetle istotnym jest pytanie, jakie są fizjologiczne mechanizmy usuwania NET i dlaczego nie zawsze są one efektywne. Ze względu na fakt, że DNA stanowi szkielet NET, pierwsze badania skoncentrowały się na DNazie obecnej w surowicy krwi (TAMKOVICH i współaut. 2006). Ponadto stwierdzono, że niektóre bakterie są zdolne do produkcji DNaz, co uznano za jeden z mechanizmów unikania, bądź ucieczki z NET (BUCHANAN i współaut. 2006). DNazy to endonukleazy produkowane przede wszystkim przez przysadkę mózgową, jelito cienkie, nerki, węzły chłonne, serce, płuca oraz w mniejszej ilości przez grasicę, śledzionę, wątrobę i mięśnie szkieletowe, z których są wydzielane do układu trawiennego i do krwiobiegu (LACKS 1981, HAKKIM i współaut. 2010). Do najlepiej poznanych DNaz należą: DNaza I, obecna przede wszystkim w krążeniu, oraz DNaza II, obecna w komórkach, umożliwiająca np. makrofagom trawienie pochłoniętego DNA komórek apoptotycznych (NAGATA 2005, NAGATA i KAWANE 2011). U części chorych na SLE obserwuje się obniżoną aktywność DNazy I, co jest związane z występowaniem w surowicy chorych inhibitorów tej endonukleazy (HAKKIM i współaut. 2010). Uznaje się zatem, że chorzy na SLE mają ograniczoną zdolność do degradacji NET, co przyczynia się do rozwoju choroby (DAVIS i współaut. 1999). Jednak jak wskazują badania m.in.

naszego zespołu, DNaza I nie jest w pełni efektywna w warunkach *in vivo*. W badaniach przeprowadzonych z zastosowaniem mikroskopii *in vivo* pokazano, że NET zalegające w naczyniach krwionośnych wątroby są tylko częściowo usuwane przez tę endonukleazę (KOLACZKOWSKA i współaut. 2015). Dzięki zastosowanej technice, która pozwala na obserwacje w czasie rzeczywistym dynamicznych procesów pokazano, że DNaza w ciągu kilku minut usuwa DNA tworzący główny szkielet NET (spełniający tę rolę na etapie ich tworzenia i tuż po wyrzuceniu z neutrofilów), ale nie przyłączone do niego białka, w tym histony i NE. Wynika to z faktu, że składowe NET przyłączają się wtórnie do białek obecnych na śródbłonku naczyniowym, takich jak VWF (GRÄSSLE i współaut. 2014, KOLACZKOWSKA i współaut. 2015). Zjawisko to także tłumaczy, przynajmniej częściowo, dlaczego sieci uszkodzają tkanki własne. Jeżeli bowiem NET mają możliwość wiązania się do struktur „kotwiczących” je w naczyniach lub tkankach, to nawet najsprawniejszy fizjologiczny mechanizm usuwania NET może nie być efektywny.

Nadal niewiele wiadomo o fizjologicznych mechanizmach usuwania NET przez organizm, a dotychczas opublikowane doniesienia pochodzą wyłącznie z badań *in vitro*. Pierwszą próbę poznania tych mechanizmów podjęli badacze z Instytutu Karolinska w Sztokholmie (Szwecja) (FARRERA i FADEEL 2013). Neutrofile wyizolowane z krwi ochotników zostały zaktywowane do wyrzutu NET poprzez stymulację syntetycznymi estrami forbolu (PMA). Sieci te zostały następnie przeniesione do hodowli makrofagów, pochodzących ze zróżnicowanych ludzkich monocytów, i z czasem były przez nie usuwane poprzez endocytozę (FARRERA i FADEEL 2013). Zewnątrzkomórkowy DNA pochodzący z NET był obecny w lizosomach makrofagów, co sugeruje, że enzymy obecne w tych strukturach są odpowiedzialne za degradację sieci. Badaczom udało się wykazać, że około 15% makrofagów brało udział w trawieniu NET oraz, że pojedyncza sieć była trawiona przez więcej niż jednego makrofaga. Szacując kinetykę usuwania sieci wykazano, że intensywność tego procesu jest największa w ciągu pierwszych dwóch godzin, po czym spada. Wykazano także, że dodanie DNazy I do hodowli makrofagów istotnie zwiększa tempo i efektywność usuwania NET (FARRERA i FADEEL 2013). Co bardzo ważne, wykazano, że proces usuwania NET nie aktywuje makrofagów, podobnie jak pochłanianie ciałek i komórek apoptotycznych, a więc nie inicjuje potencjalnie autodestruktywnej odpowiedzi zapalnej.

W kolejnych badaniach podjęto próbę fenotypowej analizy makrofagów usuwających NET. Makrofagi mogą przejawiać jeden z dwóch głównych fenotypów: aktywowanych klasycznie, prozapalnych makrofagów M1, oraz aktywowanych alternatywnie, supresyjnych, przeciwzapalnych makrofagów M2 (NAZIMEK i BRYNIARSKI 2012). Dane literaturowe wskazują, że to makrofagi typu M2 są zaangażowane w proces usuwania martwych, w tym apoptotycznych, komórek (LAUBER i współaut. 2004). Zespół z Uniwersytetu Hokkaido w Sapporo (Japonia) przeprowadził badania, w których neutrofile pochodzące od zdrowych dawców poddane zostały stymulacji PMA lub przeciwciałem anti-MPO (jednym z przeciwciał ANCA), w celu indukcji NET (NAKAZAWA i współaut. 2016). Następnie do hodowli neutrofilii, które wyrzuciły NET, dodawano makrofagi zróżnicowane uprzednio do jednego z dwóch fenotypów, M1 lub M2. Makrofagi różnicowano na dwa sposoby:

(1) monocyty krwi ludzkiej aktywowano przy użyciu czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów GM-CSF (ang. granulocyte macrophage colony-stimulating factor) do fenotypu M1 lub przy użyciu czynnika stymulującego powstawanie kolonii makrofagów M-CSF (ang. macrophage colony-stimulating factor) do fenotypu M2.

(2) alternatywnie, wykorzystano komórki linii białaczki monocytarnej (THP-1), które różnicowano w fenotyp M1 przy użyciu IFN- $\gamma$  oraz lipopolisacharydu (LPS), a w fenotyp M2 używając do tego IL-4 (NAKAZAWA i współaut. 2016).

Badaczom udało się wykazać, że w trakcie inkubacji z neutrofilami, które wyrzuciły sieci, makrofagi niezależnie od swojego fenotypu (i pochodzenia: krew/linia komórkowa) posiadały zdolność do trawienia NET. Jednak co zaskakujące, kontakt z neutrofilami, które wyrzuciły NET i/lub samymi sieciami aktywował makrofagi M2 do szybkiej (po kilku godzinach) produkcji niezgodnych z ich fenotypem cytokin pro-zapalnych, takich jak: TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  czy IL-8. Być może wynik ten należy interpretować jako wywołaną obecnością NET zmianę fenotypu makrofagów. Z kolei inkubacja makrofagów o fenotypie M1 z sieciami i neutrofilami, które je wyrzuciły, spowodowała, że niektóre makrofagi same wyrzuciły DNA (NAKAZAWA i współaut. 2016). Zdolność makrofagów do tworzenia sieci złożonych z DNA i białek przeciwbakteryjnych opisano po raz pierwszy w 2010 r. (CHOW i współaut. 2010), jednak dotychczas nie wykazano, aby NET także mogły wywołać taki efekt. W pracy grupy z Japonii stwierdzono ponadto, że makrofagi M1 ostatecznie

(w ciągu doby) skutecznie usuwały sieci wyrzucone przez neutrofile oraz własny DNA, a na końcu ginęły apoptotycznie (NAKAZAWA i współaut. 2016). Choć wiele wniosków wynikających z tej pracy jest interesujących, to jednak pozostawia ona także wiele kwestii nierozstrzygniętych. Czy obserwowany wpływ na makrofagi wynikał z ich kontaktu z NET czy też raczej z neutrofilami, które je wyrzuciły? Ewidentnie obserwowano inną aktywność makrofagów niż w badaniach grupy ze Szwecji, która nie stwierdziła produkcji żadnych cytokin, gdy makrofagi były inkubowane z samymi NET, bez neutrofilii (FARRERA i FADEEL 2013). Ponadto, jak wytłumaczyć, że makrofagi, które same wyrzuciły DNA/sieci następnie giną śmiercią zależną od obecności funkcjonalnych genów? Przede wszystkim jednak, najważniejsze pytania związane z usuwaniem NET ciągle pozostają bez odpowiedzi: (i) jakie receptory na makrofagach są zaangażowane w rozpoznanie składowych NET, (ii) jak te komórki, bez zaangażowania DNazy I, są w stanie usuwać NET, których rozmiary są dużo większe od nich samych. I wreszcie (iii) jak ten proces przebiega w naczyniach krwionośnych i tkankach oraz (iv) czy makrofagi to jedyne komórki, które usuwają sieci w organizmie?

## TERAZNIEJSZOŚĆ A PRZYSZŁOŚĆ

Poznanie fizjologicznych sposobów, poprzez które neutrofilowe sieci zewnątrzkomórkowe mogą być usuwane stanowi bardzo ważny aspekt biologii neutrofilii, mogący rzucić światło na rozwój chorób/stanów patologicznych, w których NET odgrywają kluczową rolę. Opublikowane dotychczas prace, skupiające się na potencjale makrofagów, profesjonalnych fagocytów, do trawienia i usuwania NET, niewątpliwie przedstawiają nowe informacje, jednak nie są rozstrzygające. Przede wszystkim jednak są to badania przeprowadzane w warunkach *in vitro*. Ogromny rozwój technik obserwacji mikroskopowej jaki dokonał się w ciągu kilku ostatnich lat, a w szczególności związany z wykorzystaniem mikroskopii *in vivo* daje zdecydowanie większe możliwości.

Kolejną kontrowersją związaną z badaniami nad NET i ich usuwaniem jest sposób indukcji NET poprzez stosowanie syntetycznego PMA. W rzeczywistych układach biologicznych, NET są konsekwencją infekcji, wnikięcia drobnoustrojów do organizmu lub uwolnienia DAMP w czasie zapalenia sterylnego. Biorąc pod uwagę, że skład NET może być różny w zależności od zastosowanego stymulanta (URBAN i współaut. 2009), mechanizm ich usuwania również może być



zróznicowany, a to sugeruje zmianę metodologii przysyłych badań.

Odkryte i opisane jako nowy sposób walki neutrofilów z patogenami NET, istotnie spełniają ważną funkcję w kontrolowaniu zakażenia i eliminacji patogenów. Pomimo poznania licznych mechanizmów prowadzących do ich tworzenia i wyrzutu, wciąż niewiele wiadomo o tym jak są usuwane. Aspekt ten jest kluczowy, zważywszy na udział NET w patogenezie licznych chorób prowadzących do uszkodzeń tkanek własnych. Kolejnym krokiem badań nad NET będzie z pewnością opracowanie skutecznej i bezpiecznej metody usuwania sieci po tym, jak już wypełnią swoje zadania, tak aby zminimalizować skutki uboczne ich tworzenia i/lub obecności.

#### Streszczenie

Neutrofilowe sieci zewnątrzkomórkowe (NET) to niedawno odkryty mechanizm, dzięki któremu neutrofile mogą skutecznie walczyć z patogenami. W wyniku aktywacji neutrofile wyrzucają zdekondensowany DNA, połączony z histonami i białkami pochodzącymi z ziarnistości. Te przestrzenne struktury mogą wylapywać, ograniczać rozprzestrzenianie się, a w niektórych przypadkach zabijać patogeny. Pomimo korzystnych efektów, NET są także odpowiedzialne za patogenezę różnych chorób autoimmunizacyjnych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, łuszczyca czy toczeń rumieniowaty układowy, a także przyczyniają się do uszkodzeń narządów w trakcie sepsy. Jak dotąd niewiele wiadomo o tym jak NET są usuwane z naczyń krwionośnych i narządów oraz przez które komórki. Istniejące, nieliczne doniesienia wskazują na udział makrofagów w usuwaniu NET, jednakże wyniki te pochodzą tylko z eksperymentów *in vitro*. Otwartym pozostaje zatem pytanie o mechanizmy tego procesu w skomplikowanym środowisku żywego organizmu. W związku z patologicznym aspektem tworzenia NET, ważnym będzie opracowanie skutecznego środka farmakologicznego zdolnego do usuwania tych struktur.

#### LITERATURA

- BIANCHI M., HAKKIM A., BRINKMANN V., ULRICH S., REINHARD A. S., ZYCHLINSKY A., REICHENBACH J., 2009. *Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis*. Blood 114, 2619-2622.
- BORREGAARD N., 2010. *Neutrophils, from marrow to microbes*. Immunity 33, 657-670.
- BOSCH X., 2011. *Lupus erythematosus and the neutrophil*. Clin. Implicat. Basic Res. Syst. 8, 6-8.
- BRILL A., FUCHS T. A., SAVCHENKO A. S., THOMAS G. M., MARTINOD K., DE MEYER S. F., BHANDARI A. A., WAGNER D. D., 2012. *Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice*. J. Thromb. Haemost. 10, 136-144.
- BRINKMANN V., ZYCHLINSKY A., 2007. *Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs*. Nat. Rev. Microbiol. 5, 577-582.
- BRINKMANN V., ZYCHLINSKY A., 2012. *Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin?* J. Cell Biol. 198, 773-783.
- BRINKMANN V., REICHARD U., GOOSMAN C., FAULER B., UHLEMANN Y., WEISS D. S., WEINRAUCH Y., ZYCHLINSKY A., 2004. *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science 303, 1532-1535.
- BUCHANAN J. T., SIMPSON A. J., AZIZ R. K., LIU G. Y., KRISTIAN S. A., KOTB M., FERAMISCO J., NIZET V., 2006. *DNase expression allows the pathogen group A Streptococcus to escape killing in neutrophil extracellular traps*. Curr. Biol. 16, 396-400.
- CHANG H. J., JYNN C., GLASS R. M., 2010. *Sepsis*. J. Am. Med. Assoc. 304, 1856.
- CHEMIN K., KLARESKOG L., MALMSTRÖM V., 2016. *Is rheumatoid arthritis an autoimmune disease?* Curr. Opin. Rheumatol. 28, 181-118.
- CHEN G. Y., NUÑEZ G., 2010. *Sterile inflammation: sensing and reacting to damage*. Nat. Rev. Immunol. 10, 826-837.
- CHEN M., KALLENBERG C. G. M., 2009. *New advances in the pathogenesis of ANCA-associated vasculitides*. Clin. Exp. Rheumatol. 27, 108-114.
- CHOW O. A., VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE M., BRIGHT A. T., HENSLER M. E., ZINKERNAGEL A. S., COGEN A. L., GALLO R. L., MONESTIER M., WANG Y., GLASS C. K., NIZET V., 2010. *Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps*. Cell Host Microbe 8, 445-454.
- CHOWDHURY C. S., GIAGLIS S., WALKER U. A., BUSER A., HAHN S., HASLER P., 2014. *Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility*. Arthrit. Res. Ther. 16, R122.
- CLARK S. R., MA A. C., TAVENER S. A., McDONALD B., GOODARZI Z., KELLY M. K., PATEL K. D., CHAKRABARTI S., MCAVOY E., SINCLAIR G. D., KEYS E. M., ALLEN-VERCOE E., DEVINNEY R., DOIG C. J., GREEN F. H. Y., KUBES P., 2007. *Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood*. Nat. Med. 13, 463-469.
- CRISPIN J. C., LIOSSIS S.-N. C., KIS-TOTH K., LIEBERMAN L. A., KYTTARIS V. C., JUANG Y.-T., TSOKOS G. C., 2010. *Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances*. Trends Mol. Med. 16, 47-57.
- CZAIKOSKI P. G., MOTA J. M. S. C., NASCIMENTO D. C., SONEGO F., CASTANHEIRA F. V. E. S., MELO P. H., SCORTEGAGNA G. T., SILVA R. L., BARROSO-SOUSA R., SOUTO F. O., PAZIN-FILHO A., FIGUEIREDO F., ALVES-FILHO J. C., CUNHA F. Q., 2016. *Neutrophil extracellular traps induce organ damage during experimental and clinical sepsis*. PLoS One 11, 1-19.
- DAVIS J. C., MANZI C., YARBORO C., RAIRIE J., MCINNES I., AVERTHELY D., SINICROPI D., HALE V. G., BALOW J., AUSTIN H., BOUMPAS D. T., KLIPPEL J. H., 1999. *Recombinant human Dnase I (rhDNase) in patients with lupus nephritis*. Lupus 8, 68-76.
- ESMON C. T., 2009. *Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis*. Blood Rev. 23, 225-29.
- FARRERA C., FADEEL B., 2013. *Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process*. J. Immunol. 191, 2647-2656.
- FAUZI A. R., KONG N. C. T., CHUA M. K., JEY-ABALAN V., IDRIS M. N., AZIZAH R., 2004. *Antibodies in systemic lupus antineutrophil cytoplasmic erythematosus: prevalence, disease activity correlations and organ system associations*. Med. J. Malaysia 59, 372-377.
- FUCHS T. A., ABED U., GOOSMAN C., HURWITZ R., SCHULZE I., WAHN V., WEINRAUCH Y., BRINKMANN V., ZYCHLINSKY A., 2007. *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. J. Cell Biol. 176, 231-241.

- FUCHS T. A., ALEXANDER B., DUERSCHMIED D., SCHATZBERG D., MONESTIER M., MYERS D. D., WROBLESKI S. K., WAKEFIELD T. W., HARTWIG J. H., WAGNER D. D., 2010. *Extracellular DNA traps promote thrombosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 15880-15885.
- GOULD T. J., LYSOV Z., LIAW P. C., 2015. *Extracellular DNA and histones: double-edged swords in immunothrombosis*. J. Thromb. Haemost. 13, 82-91.
- GRÄSSLE S., HUCK V., PAPPELBAUM K. I., GORZELANNY C., APONTE-SANTAMARÍA C., BALDAUF C., GRÄTER F., SCHNEPPENHEIM R., OBSER T., SCHNEIDER S. W., 2014. *Von Willebrand factor directly interacts with DNA from neutrophil extracellular traps*. Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol. 34, 1382-89.
- GUPTA A. K., JOSHI M. B., PHILIPPOVA M., ERNE P., HASLER P., HAHN S., RESINK T. J., 2010. *Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death*. FEBS Lett. 584, 3193-3197.
- HAKKIM A., FÜRNRÖHR B. G., AMANN K., LAUBE B., ABU ABED U., BRINKMANN V., HERRMANN M., VOLL R. E., ZYCHLINSKY A., 2010. *Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 9813-9818.
- HAZELDINE J., HAMPSON P., LORD J. M., 2014. *The impact of trauma on neutrophil function*. Injury 45, 1824-1833.
- HU S., YU H., YEN F., LIN C., CHE G., LAN C., 2016. *Neutrophil extracellular trap formation is increased in psoriasis and induces human  $\beta$ -defensin-2 production in epidermal keratinocytes*. Scient. Rep. 6, 31119.
- IWASHYNA T. J., WESLEY E. E., SMITH D. M., LANGA K. M., 2011. *Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis*. J. Am. Med. Assoc. 304, 1787-1794.
- KAMBAS K., MITROULIS I., KONSTANTINOS R., 2012. *The emerging role of neutrophils in thrombosis - the journey of TF through NETs*. Front. Immunol. 3, 1-8.
- KESSENBRÖCK K., KRUMBHOLZ M., SCHÖNERMARCK U., BACK W., GROSS W. L., WERB Z., GRÖNE H.-J., BRINKMANN V., JENNE D. E., 2009. *Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis*. Nat. Med. 15, 623-625.
- KHANDPUR R., CARMONA-RIVERA C., VIVEKANANDAN-GIRI A., GIZINSKI A., YALAVARTHI S., KNIGHT J. S., FRIDAY S., LI S., PATEL R. M., SUBRAMANIAN V., THOMPSON P., CHEN P., FOX D. A., PENNATHUR S., KAPLAN M. J., 2013. *NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis*. Sci. Transl. Med. 5, 178ra40.
- KOLACZKOWSKA E., KUBES P., 2013. *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. Nat. Rev. Immunol. 13, 159-175.
- KOLACZKOWSKA E., JENNE C.N., SUREWAARD B. G. J., THANABALASURIAR A., LEE W.-Y., SANZ M.-J., MOWEN K., OPDENAKKER G., KUBES P., 2015. *Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature*. Nat. Comm. 6, 6673.
- KOWAL C., DEGIORGIO L. A., LEE L. Y., EDGAR M. E., HUERTA P. T., VOLPE B. T., DIAMOND B., 2006. *Human lupus autoantibodies against NMDA receptors mediate cognitive impairment*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 19854-19859.
- LACKS S. A., 1981. *Deoxyribonuclease I in mammalian tissues. Specificity of inhibition by actin*. J. Biol. Chem. 256, 2644-2648.
- LANDE R., GANGULY D., FACCHINETTI V., FRASCA L., CURDIN CONRAD, JOSH GREGORIO, MELLER S., CHAMILOS G., SEBASIGARI R., RICCIERI V., BASSETT R., AMURO H., FUKUHARA S., ITO T., LIU Y.-J., GILLIET M., 2011. *Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA peptide complexes in systemic lupus erythematosus*. Sci. Transl. Med. 3, 73ra19.
- LAUBER K., BLUMENTHAL S. G., WAIBEL M., WESSELBORG S., 2004. *Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses*. Mol. Cell 14, 277-287.
- LI P., LI M., LINDBERG M. R., KENNETT M. J., XIONG N., WANG Y., 2010. *PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps*. J. Exp. Med. 207, 1853-1862.
- LUO L., ZHANG S., WANG Y., RAHMAN M., SYK I., ZHANG E., THORLACIUS H., 2014. *Proinflammatory role of neutrophil extracellular traps in abdominal sepsis*. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 307, L586-L596.
- MAKRYGIANNAKIS D., AF KLINT E., LUNDBERG I. E., LÖFBERG R., ULFGREN A-K., KLARESOG L., CATRINA A. I., 2006. *Citrullination is an inflammation-dependent process*. Ann. Rheumat. Dis. 65, 1219-1222.
- MANSON J. J., MA A., ROGERS P., MASON L. J., BERDEN J. H., VAN DER VLAG J., D'CRUZ D. P., ISENBERG D. A., RAHMAN A., 2009. *Relationship between anti-dsDNA, anti-nucleosome and anti-alpha-actinin antibodies and markers of renal disease in patients with lupus nephritis: a prospective longitudinal study*. Arthritis Res. Ther. 11, R154.
- MARTINOD K., MELANIE D., FUCHS T. A., WONG S. L., BRILL A., GALLANT M., HU J., WANG Y., WAGNER D. D., 2013. *Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110, 8674-8679.
- MARTINOD K., WITSCH T., FARLEY K., GALLANT M., REMOLD-O'DONNELL E., WAGNER D. D., 2016. *Neutrophil elastase-deficient mice form neutrophil extracellular traps in an experimental model of deep vein thrombosis*. J. Thromb. Haemost. 14, 551-58.
- MASSBERG S., GRAHL L., VON BRUEHL M-L, MANUKYAN D., PFEILER S., GOOSMANN C., BRINKMANN V., LORENZ M., BIDZHEKOV K., KHANDAGALE A. B., KONRAD I., KENNERKNECHT E., REGES K., HOLDENRIEDER S., BRAUN S., REINHARDT C., SPANNAGL M., PREISSNER K. T., ENGELMANN B., 2010. *Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases*. Nat. Med. 16, 887-896.
- MCDONALD B., URRUTIA R., YIPP B. G., JENNE C. N., KUBES P., 2012. *Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis*. Cell Host Microbe 12, 324-333.
- MURPHY G., NAGASE H., 2008. *Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair?* Nat. Rev. Rheumatol. 4, 128-135.
- NAGATA S., 2005. *DNA degradation in development and programmed cell death*. Ann. Rev. Immunol. 23, 853-875.
- NAGATA S., KAWANE K., 2011. *Autoinflammation by endogenous DNA*. Adv. Immunol. 10, 139-161.
- NAKAZAWA D., SHIDA H., KUSUNOKI Y., MIYOSHI A., NISHIO S., TOMARU U., ATSUMI T., ISHIZU A., 2016. *The responses of macrophages in interaction with neutrophils that undergo NETosis*. J. Autoimmun. 67, 19-28.

- NAUSEEF W. M., BORREGAARD N., 2014. *Neutrophils at work*. Nat. Immunol. 15, 602-611.
- NAZIMEK K., BRYNIARSKI K., 2012. *The biological activity of macrophages in health and disease*. Post. Hig. Med. Dośw. 66, 507-520.
- O'SULLIVAN K. M., LO C. Y., SUMMERS S. A., ELGASS K. D., MCMILLAN P. J., LONGANO A., FORD S. L., GAN P.-Y., KERR P. G., KITCHING A. R., HOLDSWORTH S. R., 2015. *Renal participation of myeloperoxidase in antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated glomerulonephritis*. Kidney Internat. 88, 1030-1046.
- PAPAYANNOPOULOS V., METZLER K. D., HAKKIM A., ZYCHLINSKY A., 2010. *Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps*. J. Cell Biol. 191, 677-691.
- PILSCZEK F. H., SALINA D., POON K. K. H., FAHEY C., YIPP B. G., SIBLEY C. D., ROBBINS S.M., GREEN F. H. Y., SURETTE M. G., SUGAI M., BOWDEN G., HUSSAIN M., ZHANG K., KUBES P., 2010. *A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus*. J. Immunol. 185, 7413-7425.
- PRATESI F., DIONI I., TOMMASI C., ALCARO A. C., PAOLINI I., BARBETTI F., BOSCARO F., PANZA F., PUXEDDU I., ROVERO P., MIGLIORINI P., 2014. *Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps*. Ann. Rheumat. Dis. 73, 1414-1422.
- ROCHAEL N. C., GUIMARÃES-COSTA A. B., NASCIMENTO M. T. C., DESOUZA-VIEIRA T., OLIVEIRA M. P., GARCIA E SOUZA L. F., OLIVEIRA M. F., SARAIVA E. M., 2015. *Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of neutrophil extracellular traps triggered by Leishmania parasites*. Scien. Rep. 5, 18302.
- RUIZ-IRASTORZA G., CROWTHER M., BRANCH W., KHAMASHTA M. A., 2010. *Antiphospholipid syndrome*. Lancet 376, 1498-1509.
- SKRZECZYNSKA-MONCZNIK J., ZABIEGLO K., BOSSOWSKI J. P., OSIECKA O., WŁODARCZYK A., KAPINSKA-MROWIECKA M., KWITNIEWSKI M., MAJEWSKI P., DUBIN A., CICHY J., 2017. *Eosinophils regulate interferon alpha production in plasmacytoid dendritic cells stimulated with components of neutrophil extracellular traps*. J. Interf. Cytokine Res. 37, 119-128.
- SMITH C. K., KAPLAN M. J., 2015. *The role of neutrophils in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. Int. Immunopharmacol. 27, 448-453.
- STEINBERG B. E., GRINSTEIN S., 2007. *Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death*. Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment 379, pe11.
- TAMKOVICH S. N., CHEREPANOVA A. V., KOLESNIKOVA E. V., RYKOVA E. Y., PYSHNYI D.V., VLASSOV V. V., LAKTIONOV P. P., 2006. *Circulating DNA and DNase activity in human blood*. Ann. NY Acad. Sci.1075, 191-196.
- TSOKOS G. C., 2011. *Systemic Lupus Erythematosus*. New Engl. J. Med. 365, 2110-2121.
- URBAN C. F., ERMERT D., SCHMID M., ABU-ABED U., GOOSMANN C., NACKEN W., BRINKMANN V., JUNGBLUT P. R., ZYCHLINSKY A., 2009. *Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against Candida albicans*. PLoS Path. 5, e1000639.
- VIATTE S., PLANT D., RAYCHAUDHURI S., 2013. *Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis*. Nat. Rev. Rheumatol. 9, 141-153.
- WANG Y., LI M., STADLER S., CORRELL S., LI P., WANG D., HAYAMA R., LEONELLI L., HAN H., GRIGORYEV S. A., ALLIS C. D., COONROD S. A., 2009. *Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation*. J. Cell Biol. 184, 205-213.
- WRIGHT H. L., MOOTS R. J., EDWARDS S. W., 2014. *The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis*. Nat. Rev. Rheumatol.10, 593-601.
- YIPP B. G., KUBES P., 2016. *NETosis: how vital is it ?* Blood 122, 2784-2795.
- YOSHIDA M., SASAKI M., SUGISAKI K., YAMAGUCHI Y., YAMADA M., 2013. *Neutrophil extracellular trap components in fibrinoid necrosis of the kidney with myeloperoxidase-ANCA-associated vasculitis*. Clin. Kidney J. 6, 308-312.
- YU Y., SU K., 2013. *Neutrophil extracellular traps and systemic lupus erythematosus*. J. Clin. Cell. Immunol. 4, 139.

**KOSMOS Vol. 66, 4, 623–634, 2017**

MICHAŁ SANTOCKI, ELŻBIETA KOŁACZKOWSKA

*Department of Evolutionary Immunology, Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University, Gronostajowa 9, 30-387 Kraków,*

*E-mail: ela.kolaczowska@uj.edu.pl*

BEYOND RELEASE OF NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS (NETS) BY NEUTROPHILS: ON COLLATERAL CONSEQUENCES OF THEIR RELEASE AND IMPAIRED REMOVAL

Summary

Neutrophil extracellular traps (NET) represent a recently discovered mechanism by which neutrophils can efficiently fight pathogens. Upon activation, neutrophils release decondensed extracellular DNA decorated with histones and granular proteins. These three-dimensional structures can trap pathogens, limit their spread and sometimes kill them. Despite their beneficial effects, NETs are also involved in pathogenesis of various autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis, psoriasis or systemic lupus erythematosus, and also contribute to organ damage during sepsis. So far, little is known on how NETs are removed from vasculature and tissues, and by which cells. Limited available studies indicate that macrophages might remove NETs, but these results were obtained *in vitro*. Thus it remains unknown how this process occurs in a complex milieu of the body. Due to the pathological aspect of NET formation, a challenge for the near future will be development of pharmacological agents capable of NET removal.

Key words: macrophages, NET, neutrophil, sepsis, tissues damage