

Streszczenie pracy doktorskiej „Wpływ czynników wirulencji *Candida albicans* oraz promieniowania ultrafioletowego i wybranych leków na proces formowania neutrofilowych pułapek zewnątrzkomórkowych”

Układ immunologiczny człowieka pełni szereg funkcji odpornościowych oraz regulacyjnych, odpowiadających za utrzymanie homeostazy organizmu. Głównymi komórkami tego systemu są neutrofile, które stanowią pierwszą linię obrony przeciwko patogenom dzięki hamowaniu rozwoju infekcji przez ograniczanie rozprzestrzeniania się mikroorganizmów w głąb tkanek gospodarza oraz ich zabijanie. Funkcje te realizowane są dzięki wykorzystaniu stosunkowo nowo poznanego mechanizmu zwalczania mikroorganizmów, jakim jest uwalnianie tak zwanych *neutrofilowych pułapek zewnątrzkomórkowych* (NET, ang. *Neutrophil Extracellular Traps*). Pułapki te zbudowane są z chromatyny oraz wkomponowanych białek granuli o właściwościach biobójczych, takich jak elastaza, mieloperoksydaza, katepsyna G, a także peptydów antybakteryjnych (np. LL-37). NET skutecznie zatrzymują rozprzestrzenianie się patogenów, a aktywność enzymów i czynników biobójczych zawartych w ich strukturze uszkadza mikroorganizmy prowadząc do ich śmierci. Uwalnianie NET, nazwane „netozą”, jest formą śmierci neutrofilu, która może zostać wywołana przez szereg czynników biologicznych, takich jak bakterie, grzyby, wirusy oraz pasożyty, a także czynniki chemiczne. W aktywację procesu zaangażowanych jest wiele receptorów z rodziny Toll-podobnych (TLR), lektynowych typu C, a także wchodzących w skład układu dopełniacza (CR3). W zależności od czynnika aktywującego netoza może zostać uruchomiona na drodze zależnej oraz niezależnej od reaktywnych form tlenu (ROS).

Aktywacja neutrofilu prowadząca do formowania NET może nastąpić w odpowiedzi na infekcję z udziałem drożdżaków z rodzaju *Candida*, których przedstawicielem jest *Candida albicans*. Drożdżak ten jest patogenem oportunistycznym powodującym niebezpieczne, trudne do leczenia zakażenia. Rozwój infekcji z udziałem tego drożdżaka ułatwia szereg jego czynników wirulencji. Należy do nich zaliczyć zdolność zmiany formy morfologicznej z komórkowej na strzępkową, produkcję białek adhezyjnych, a także ekspresję proteaz aspartylowych (Sap). Ponadto, patogen ten wykazuje dynamiczną zmienność w składzie i budowie ściany komórkowej, modyfikując ilość β -glukanów oraz mannanów na powierzchni, jak również skład białkowy, co pozwala mu unikać działań ze strony układu odpornościowego.

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu wybranych czynników biologicznych (komórki drożdżaków *C. albicans*) oraz fizycznych (promieniowanie ultrafioletowe) na proces netozy, a także zbadanie zdolności modulacji tego procesu przez wybrane, powszechnie stosowane leki.

Pierwszym celem było określenie zdolności do aktywacji procesu netozy przez różne formy morfologiczne drożdżaka *C. albicans* oraz wybrane czynniki jego wirulencji, eksponowane na powierzchni komórek *C. albicans*. W toku badań wykazano, że forma strzępkowa drożdżaka jest bardziej narażona na formowanie NET przez będące z nią w kontakcie neutrofile. Izolowane z powierzchni *C. albicans* β -glukany oraz mannany stymulują neutrofile do uwalniania NET. Z kolei składniki białkowe, eksponowane na powierzchni, takie jak enolaza oraz adhezyny aglutyninopodobne (Als3) wydają się mieć mniejsze znaczenie w tym procesie. Inna grupa białek – m.in. Sap, w większości uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, wykazały zróżnicowaną aktywację mechanizmu netozy. Spośród dziesięciu znanych enzymów Sap, siedem z nich posiada zdolność indukcji netozy, z maksymalną wydajnością formowania NET obserwowaną dla Sap6. Badania z udziałem odpowiednich mutantów *C. albicans*, pozbawionych możliwości produkcji wybranych Sap, potwierdziły wyniki uzyskane dla oczyszczonych enzymów.

W kolejnym etapie pracy wytypowano receptory powierzchniowe neutrofilii zaangażowane w rozpoznawanie wybranych czynników *C. albicans*, skorelowane z produkcją NET. Wykazano, iż indukcja netozy przez glukany zachodzi z udziałem następujących receptorów: dektyny-1 oraz CD11b/CD18 (Mac-1; CR3), natomiast mannany indukują netozę wykorzystując receptory TLR2 oraz TLR4, a także dektynę-1 i CD11b. W rozpoznawaniu Sap i aktywacji netozy udział biorą głównie receptory układu dopełniacza CR3 oraz CD16. Pokazano także rezultaty wstępnych badań oddziaływania Sap6 z powierzchnią neutrofilii, inicjującego dalszą kaskadę regulacyjną formowania NET. Ponadto, badania mediatorów szlaku sygnałowego netozy wykazały, iż Sap4 oraz Sap6, w przeciwieństwie do pozostałych proteaz, aktywują niezależną od ROS ścieżkę netozy. Natomiast rolę ROS jako mediatorów sygnału netozy potwierdzono w odpowiedzi na działanie glukanów. Mannany aktywują ten proces w mechanizmie niezależnym od ROS.

Odrębny etap badań stanowiło określenie wpływu czynnika fizycznego promieniowania ultrafioletowego z zakresu UVA oraz UVB, na proces netozy. Wykazano, iż promieniowanie UV

w określonym zakresie dawek nie powoduje indukcji apoptozy oraz gwałtownej śmierci neutrofilii, natomiast bardzo silnie indukuje uwalnianie NET, w mechanizmie zależnym od ROS. Z uwagi na fakt, że NET są źródłem wielu enzymów proteolitycznych oraz ROS, obserwowany efekt indukcji netozy może być istotnym zjawiskiem w procesie fotostarzenia skóry. Analiza aktywowanego szlaku sygnałowego netozy pozwoliła na wskazanie możliwości wykorzystania związków o potencjale antyoksydacyjnym (N-Acetylocysteina, etamsylat, witamina B1) w eliminacji negatywnych dla organizmu skutków uwalniania NET pod wpływem UV.

W ostatnim etapie badań oceniono wpływ leków o szerokim zastosowaniu terapeutycznym na proces netozy. Poddano analizie preparaty z grupy mukolitycznych (N-acetylocysteina), przeciwuczuleniowych (klemastyna, hydrokortyzon), przeciwzapalnych (ketoprofen) oraz hemostatycznych (etamsylat). Wykazano, iż leki te w dawkach terapeutycznych nie są toksyczne względem neutrofilii, jednakże, N-acetylocysteina oraz etamsylat redukują zdolność tworzenia ROS, co może przekładać się na ograniczenie zdolności biobójczych tych komórek. Wpływ badanych leków na netozę oraz ich mechanizm działania wykazał, że N-acetylocysteina hamuje indukcję NET przez inhibicję ROS, natomiast etamsylat także ogranicza netozę, jednak jego działanie jest niezależne od produkcji ROS. Jedynie ketoprofen indukuje produkcję NET. Otrzymane wyniki wskazują na nowe, nie badane do tej pory, skutki działania wybranych leków.

Niniejsza praca, dzięki szerokiemu spojrzeniu na proces netozy oraz jego molekularne podłoże znacznie wzbogaciła aktualny stan wiedzy na jego temat. Wskazanie udziału czynników wirulencji *C. albicans* oraz szlaków sygnałowych zaangażowanych w aktywację netozy, pozwala lepiej zrozumieć naturę wzajemnych interakcji między układem odpornościowym a patogenem, a także mechanizmy ucieczki intruza przed komórkami obronnymi, co może być podstawą do opracowania skuteczniejszych terapii przeciwgrzybiczych. Wskazanie udziału promieniowania UV w aktywacji netozy może przyczynić się do opracowania metod terapeutycznych ograniczających negatywne skutki działania promieniowania na skórę człowieka. Z kolei spojrzenie na wpływ wybranych leków na formowanie NET pozwala na wykorzystanie badanych związków w regulacji procesu netozy, a także wskazuje na potencjalne skutki uboczne ich stosowania.

Spis publikacji:

Zawrotniak, M., Kozik, A., i Rapala-Kozik, M. (2015). **Selected mucolytic, anti-inflammatory and cardiovascular drugs change the ability of neutrophils to form extracellular traps (NETs).** *Acta Biochim. Pol.* 62, 465–73.

Zawrotniak, M., i Rapala-Kozik, M. (2013). **Neutrophil extracellular traps (NETs) - Formation and implications.** *Acta Biochim. Pol.* 60, 277–284. [artykuł przeglądowy]

