

Mgr Katarzyna Zabiegło

Streszczenie rozprawy doktorskiej  
Tytuł: „SLPI jako czynnik regulujący  
tworzenie i funkcje sieci neutrofilowych”

Tworzenie zewnątrzkomórkowych sieci, inaczej pułapek (NETs), poprzez uwolnienie do przestrzeni pozakomórkowej zawartości jądra komórkowego zmieszanych ze składnikami ziarnistości/cytoplazmy, stanowi jedną ze strategii neutrofilów w walce z patogenami w czasie infekcji. Naciekające tkanki neutrofile oraz nadmierna produkcja sieci są cechami charakterystycznymi także dla szeregu chronicznych chorób o podłożu zapalnym, a w tym autoimmunizacyjnym, takich jak toczeń rumieniowaty układowy (SLE) czy łuszczyca. W wyżej wymienionych chorobach składniki sieci mogą powodować destrukcję tkanek oraz być źródłem autoantygenów. Stąd, badanie mechanizmów tworzenia pułapek oraz poszukiwanie inhibitorów tego zjawiska jest niezwykle istotne. Jednym z czynników o kluczowej roli w powstawaniu sieci jest elastaza neutrofilowa (NE). W pracy po raz pierwszy wykazano, że wydzielniczy inhibitor proteinaz serynowych leukocytów (SLPI), będący głównym inhibitorem NE w neutrofilach, ma zdolność selektywnego hamowania procesu powstawania pułapek. Wpływ egzogenego SLPI na proces powstawania sieci badano *in vitro* z użyciem ludzkich neutrofilów, izolowanych z krwi obwodowej dawców zdrowych, stymulowanych za pomocą znanych czynników inicjujących tworzenie pułapek, takich jak: PMA, *Staphylococcus aureus* oraz cytokiny prozapalne - TNF $\alpha$ . W celu określenia, w jaki sposób SLPI hamuje tworzenie NETs, badano lokalizację komórkową inhibitora. Zaobserwowano, że w aktywowanych neutrofilach, jądro komórkowe jest głównym miejscem lokalizacji SLPI, gdzie dodatkowo SLPI może kolokalizować z NE. Wiadomo, że w tworzeniu sieci bardzo istotną rolę odgrywa dekondensacja chromatyny, która może zależeć od modyfikacji proteolitycznej histonów stabilizujących strukturę chromatyny, takich jak histony H4. W wyżej wymienionym procesie uczestniczy NE. W pracy potwierdzono hipotezę, że SLPI hamuje tworzenie pułapek poprzez hamowanie procesu degradacji histonów w jądrze i w związku z tym badano, czy aktywność anty-proteazowa SLPI jest odpowiedzialna za ten efekt. Badania z użyciem mutantów SLPI, które różniły się aktywnością enzymatyczną względem NE, oraz pokrewnych proteaz, tj. chymotrypsyny i trypsyny, wykazały, że efekt hamowania NETs przez SLPI jest tylko częściowo zależny od aktywności inhibitorowej względem NE. Dodatkowo, dalsze eksperymenty wykazały, że neutrofile izolowane ze szpiku kostnego myszy z deficytem genetycznym SLPI są bardziej wrażliwe na wyrzut NETs *in vitro*,

niż te pochodzące z myszy kontrolnych, co z kolei potwierdziło ważną rolę endogennego SLPI w regulacji tworzenia NETs. Co więcej, endogenny SLPI był odnajdywany w jądrze komórkowym neutrofilów w kolokalizacji z NE zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, tj. w jądrze infiltrujących skórę tłuszczycową neutrofilów. Na podstawie uzyskanych wyników, które wykazały hamujący wpływ SLPI na tworzenie NETs, wydawało się prawdopodobne, że w chorobach, w których obserwuje się „nadprodukcję” sieci, poziom SLPI względem NE w neutrofilach może ulec zmniejszeniu. Dlatego, w kolejnym etapie badano, czy neutrofile osób cierpiących na choroby autoimmunizacyjne różnią się pod względem immunoreaktywności względem SLPI i NE, w stosunku do neutrofilów osób zdrowych. W ludzkiej krwi obwodowej obserwuje się dwie populacje neutrofilów; główną – PMN oraz tzw. LDG – neutrofile niskiej gęstości. Pojawianie się populacji LDG we krwi opisano po raz pierwszy u pacjentów chorych na SLE, i te komórki wskazano jako wyjątkowo wrażliwe na tworzenie NETs. W niniejszej pracy wykazano obecność LDG także we krwi obwodowej pacjentów cierpiących na łuszczycę. Wykazano również, że populacja ta charakteryzuje się zwiększoną immunoreaktywnością wobec NE oraz zmniejszoną wobec SLPI, w porównaniu z PMN. Zatem, można przypuszczać, iż wykazana zależność jest powodem zwiększonej wrażliwości LDG na tworzenie pułapek. Biorąc pod uwagę fakt, iż odsetek LDG jest wyższy we krwi pacjentów z łuszczycą, to właśnie ta populacja może wykazywać istotną rolę w rozwoju choroby. Co ważne, na podstawie wyników uzyskanych w pracy, wydaje się, że neutrofile naciekające skórę tłuszczycową wykazują podobny, a wręcz jeszcze bardziej spektakularny, profil immunoreaktywności względem NE i SLPI, niż LDG. Podsumowując, w pracy wykazano właściwości hamujące SLPI na tworzenie pułapek, a regulacyjna rola SLPI w wyżej wymienionym procesie oparta jest na przynajmniej dwóch mechanizmach: zależnym oraz niezależnym od właściwości inhibitorowych SLPI względem NE. Wykazano również odmienny profil immunoreaktywności SLPI/NE w komórkach LDG w stosunku do PMN, która może tłumaczyć „łatwość” neutrofilów, związanych z chorobami skóry o podłożu autozapalnym np. łuszczycy, do tworzenia NETs.

K. Zabiegło