

Received: 2011.12.05
Accepted: 2012.05.16
Published: 2012.06.22

NET i NEToza – nowe zjawisko w immunologii

NET and NETosis – new phenomenon in immunology

Natalia Matoszka^{1,2}, Joanna Działo^{1,2}, Beata Tokarz-Deptuła², Wiesław Deptuła¹

¹ Katedra Mikrobiologii

² Katedra Immunologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński

Streszczenie

Neutrofile są jednymi z pierwszych komórek układu odpornościowego pojawiającymi się w miejscu wystąpienia infekcji, reprezentując jeden z najskuteczniejszych i najszybszych sposobów walki organizmu z patogenami. Niedawno opisano nowy mechanizm stosowany przez neutrofile wobec patogenów – komórki te, po aktywacji, uwalniają DNA z jądra komórkowego oraz zawartość ziarnistości znajdujących się w cytoplazmie, tworząc NET – zewnątrzkomórkową sieć neutrofilów. Ta zewnątrzkomórkowa struktura, zawierająca również histony oraz białka ziarnistości komórek PMN, jest zdolna uwięzić i zniszczyć wiele patogenów, w tym bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne, grzyby, pierwotniaki i wirusy. Niektóre z patogenów, które po uwięzieniu narażone zostają na wysokie stężenie substancji bójczych, wykształciły mechanizmy obronne wobec wiązania przez sieć NET, takie jak modyfikacja powierzchni komórek i/lub niszczenie DNA wchodzącego w skład sieci NET z użyciem DNaz. Sugeruje się, że sieci NET wytwarzane są w procesie aktywnej śmierci komórki, nazwanej w ostatnim czasie NETosis. Nowe dane wskazują, że ten rodzaj śmierci komórkowej wymaga współdziałania trzech procesów: produkcji reaktywnych form tlenu, cytrulinacji histonów w komórkach PMN oraz zdolności tych komórek do przeprowadzenia autofagii, oraz znacznie różni się od znanych dotąd typów śmierci, takich jak apoptoza czy nekroza. Co więcej, uwalnianie podobnych sieci zaobserwowano także w przypadku innych komórek – mastocytów (komórek tucznych) i eozynofili. Komórki tuczne, analogicznie jak neutrofile, w określonych warunkach uwalniają chromatynę jądrową i mogą wejść w podobny program aktywnej śmierci komórkowej, natomiast sieć wytwarzana przez eozynofile zawiera wyłącznie chromatynę pochodzenia mitochondrialnego, a jej uwolnienie nie prowadzi do obumierania tych komórek.

Słowa kluczowe:

neutrofile • sieć NET • NETosis • śmierć komórki

Summary

Neutrophils are one of the first cells of the immune system recruited to the site of infection, representing the host's most effective and numerous front-line defenders. Recently, a novel antimicrobial mechanism of neutrophils has been described: upon activation, they release DNA and a subset of their granule content, forming neutrophil extracellular traps (NETs). These extracellular, chromatin structures, which contain histones and neutrophil granule proteins, can trap and kill a broad spectrum of microbes, including Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi, protozoa and viruses. Some of the pathogens, which are trapped and exposed to high local concentrations of antimicrobial compounds, employ strategies against NET binding, including surface modification and/or degradation of NET by DNases. It has been suggested that NETs are formed during active cell death, recently named NETosis. New data indicate that this novel mechanism of cell death requires interaction between three processes – reactive oxygen species generation,

* Praca finansowana z grantu badawczego MNiSW nr N308 28 99 37.

histone citrullination and autophagy – and significantly differs from previously known types of cell death, including apoptosis and necrosis. Moreover, the release of nuclear chromatin was also described for other types of cells – mast cells and eosinophils. Mast cells, like neutrophils, under certain conditions release nuclear chromatin and may undergo a similar active cell death program, while eosinophils release only mitochondrial chromatin, and its release does not lead to the death of these cells.

Key words: neutrophils • NET • NETosis • cell death

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1001178>

Word count: 4630

Tables: –

Figures: –

References: 58

Adres autora: prof. Wiesław Deptuła, Katedra Mikrobiologii Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński, ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin; e-mail: kurp13@univ.szczecin.pl

WPROWADZENIE

Jeszcze do niedawna uważano, że niszczenie i likwidacja patogennych zarazków przez neutrofile (granulocyty obojętnochłonne – komórki polimorfonuklearne – komórki PMN) odbywa się m.in. głównie poprzez proces fagocytozy [11]. W 2004 r. Brinkmann i Zychlinsky [7] opisali po raz pierwszy nowy mechanizm, odpowiedzialny za niszczenie mikroorganizmów – sieć NET (neutrophil extracellular trap), powstałą przez uwolnienie z neutrofilów do przestrzeni pozakomórkowej zawartości jądra komórkowego wraz ze składnikami ich ziarnistości. Autorzy tej pionierskiej publikacji udowodnili, że sieć ta nie jest wynikiem wycieku chromatyny związanego z dezintegracją komórki [7], a ponadto, że ze względu na szybkość formowania się sieci NET, trwająca często zaledwie kilka minut od chwili aktywacji neutrofilów, proces ten nie ma związku z apoptozą. NET jest skuteczną bronią zarówno wobec bakterii Gram-ujemnych, Gram-dodatnich, kwasoopornych [3,7,8,40], grzybów [5,47,48], pierwotniaków [15,18] jak i wirusa grypy [34]. W tym ostatnim przypadku, formowanie sieci NET opisano w neutrofilach pochodzących z płuc zainfekowanych wirusem grypy oraz w hodowli epitelialnych komórek pęcherzykowych [34]. Stwierdzono, że uwiecznione w chromatynowej sieci NET, mikroorganizmy wystawione są na działanie wysokich stężeń czynników bójczych, do których należą m.in. mieloperoksydaza (MPO), kationowe proteazy serynowe (proteinaza 3, katepsyna G, elastaza neutrofilowa), białko BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) – o właściwościach bakteriobójczych zwiększające przepuszczalność, laktoferryina, żelatynaza B, katelicydyna (LL-37), tryptaza oraz białka histonowe (histony rdzeniowe i łącznikowe histony H1) [38]. W przypadku niektórych mikroorganizmów aktywność sieci NET ogranicza się wyłącznie do ich „związania”, bez niszczenia przez bójcze składniki NET, co dotyczy m.in. *Streptococcus pneumoniae* [3], streptokoków z grupy A (GAS – Group A *Streptococcus*) [8] czy *Mycobacterium tuberculosis* [40]. Dowiedziono, że nie tylko kontakt z patogenami stymuluje formowanie się sieci NET, jako że jej uwalnianie zaobserwowano również po stymulacji takimi czynnikami, jak LPS (lipopolisacharyd),

IL-8 (interleukina 8), TNF (tumor necrosis factor – czynnik martwicy nowotworów) czy też mitogenem PMA (mirystynian octanu forbolu) [7]. Wytworzenie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych zaobserwowano także u pacjentów cierpiących na posocznicę, podczas której dochodzi do wzmożonej aktywacji trombocytów przez LPS, z udziałem receptora TLR4 [10,27]. Aktywowane w ten sposób płytki krwi przyłączają się do związanych ze śródbłonkiem naczyń, unieruchomionych neutrofilów i w ten sposób, w zaledwie 5–10 min, pobudzają je do wytwarzania sieci NET [10,27].

Opisując zjawisko uwalniania NET zauważono, że uwalnianie przez granulocyty obojętnochłonne chromatyny jądrowej to nowy, unikalny rodzaj śmierci tych komórek, nazwany NETozą (*NETosis*) [46] – zupełnie inny, niż powszechnie znane np. nekroza czy apoptoza [14]. Warto dodać, że ten nowo odkryty program śmierci komórki – NEToza, został uwzględniony w aktualnej klasyfikacji typowych i nietypowych postaci śmierci komórki [16], do których zalicza się pięć podstawowych typów śmierci komórki (apoptoza zewnętrzna, apoptoza wewnętrzna zależna i niezależna od kaspaz, regulowana nekroza, autofagia, katastrofa mitotyczna) oraz sześć nietypowych: anoikis, entozę, parthanatos, pyroptozę, kornifikację i NETosis.

CHARAKTERYSTYKA SIECI NET

Najprościej schemat uwalniania sieci NET przez granulocyty obojętnochłonne, zaproponowany przez Brinkmanna i Zychlinsky'ego [7] w 2004 r. *ex vivo*, można przedstawić następująco: w neutrofilach aktywowanych substancjami takimi jak PMA, LPS czy IL-8, dochodzi do rozpuszczenia błony jądrowej i błon ich ziarnistości oraz dekondensacji chromatyny i połączenia jej z białkami ziarnistości, co w momencie przerwania ciągłości błony komórkowej prowadzi do uwolnienia tak powstałej struktury do przestrzeni pozakomórkowej. W zależności od czynnika, który aktywował wytworzenie i uwolnienie sieci NET, jej formowanie może zająć od kilku minut do kilku godzin [14]. Powstająca sieć NET zawiera m.in. część substancji bójczych, magazynowanych w ziarnistościach

pierwszorzędowych komórek PMN, w tym m.in. elastazę neutrofilową, katepsynę G czy mieloperoksydazę, niektóre białka ziarnistości drugorzędowych (m.in. laktoferynę, pentraksynę 3 – PTX3, żelatynazę) oraz trzeciorzędowych (np. metaloproteinazę macierzy 9 – MMP9), a także działające bakterioobójczo histony oraz niektóre białka cytoplazmatyczne, które w postaci związanej z NET mają mniejszą możliwość przenikania do innych komórek czy tkanek gospodarza [7,28]. Sieć NET nie zawiera białek cytoplazmatycznych neutrofilów, takich jak aktyna czy tubulina [7,28]. Wykazano, że skupienie wyżej wymienionych substancji w jednym miejscu zwiększa bójcze działanie wobec patogenów uwięzionych w sieci NET, które wspomagane jest dodatkowo bakterioobójczymi właściwościami histonów [39]. Ponadto wytworzona sieć NET, pozostając związana z uwalniającą ją komórką, utrzymuje się i działa nawet wtedy, gdy neutrofile tracą już zdolność do przeprowadzania procesu fagocytozy lub utraciły ją po zablokowaniu farmakologicznym, np. w wyniku zastosowania inhibitora mikrofilamentów aktynowych - cytochalazyny D [7]. Dodatkowo, wytwarzane sieci NET są także swoistego rodzaju barierą fizyczną, zapobiegającą rozprzestrzenianiu się patogenów i umożliwiającą złapanie, unieszkodliwienie i/lub zniszczenie dużej liczby mikroorganizmów jednocześnie. Mimo tych danych, nadal trwają badania nad wpływem uwalniania sieci NET na funkcjonowanie obronności gospodarza, jak też mechanizmem usuwania przez niego wytworzonych sieci [1]. Obecnie wiadomo, że proces uwalniania zewnątrzkomórkowych sieci (ET – extracellular traps) wykryto nie tylko w przypadku komórek PMN, ale także w komórkach tucznych (mastocytach) [49], pod wpływem takich czynników, jak PMA, LL-37 czy zakażeń bakteryjnych np.: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Streptococcus pyogenes*. W mastocytach, podobnie jak w przypadku neutrofilów, dochodzi do rozpuszczenia otoczki jądrowej i uwolnienia zdecondensowanej chromatyny wraz z histonami, połączonej z zawartością ziarnistości tych komórek [49,50]. W badaniach przeprowadzonych z użyciem *Streptococcus pyogenes* [49], wobec których proces fagocytozy jest nieskuteczny, stwierdzono, że drobnoustroje te nie tylko stymulują powstanie zewnątrzkomórkowej sieci mastocytów (MCET – mast cells extracellular traps), ale także zostają w niej „uwięzione” i zniszczone. Udowodniono, że analogicznie jak w przypadku neutrofilów, proces uwalniania MCET zależy jest także od obecności reaktywnych form tlenu i po zakończeniu tego procesu komórka obumiera. Innymi komórkami układu odpornościowego, u których obserwuje się „wyrzucenie” chromatynowej sieci (EET – eosinophils extracellular traps), są granulocyty kwasochłonne (eozynofile). Dowiedziano, że stymulacja tych komórek LPS, składnikiem dopełniacza 5a (C5a) lub eotaksyną po wcześniejszym kontakcie z IFN- γ lub interleukiną 5 (IL-5), prowadzi do wyrzucenia do przestrzeni pozakomórkowej DNA mitochondrialnego [56], wymieszanego z magazynowanymi w eozynofilach białkami, takimi jak kationowe białko eozynofilów (ECP – eosinophil cationic protein) oraz główne białko zasadowe (MBP – major basic protein). Trzeba dodać, że EET wytwarzane przez eozynofile różnią się od sieci NET i MCET tym, że uwalniana przez nie chromatyna pochodzi z mitochondriów, zatem nie zawiera w swojej strukturze histonów. Ponadto stwierdzono, że otoczka jądrowa eozynofilów pozostaje nienaruszona, stąd proces tworzenia EET nie wiąże się bezpośrednio z ich śmiercią.

Zjawisko uwalniania przez eozynofile zewnątrzkomórkowych sieci *in vivo*, zaobserwowano w przebiegu choroby Crohna oraz przy niektórych chorobach skóry [45]. Należy dodać, iż w przypadku neutrofilów stymulacja ich składnikiem C5a, po uprzednim ich kontakcie z IFN- γ , IFN- α lub GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów) również wiąże się z wytworzeniem i bardzo szybkim uwolnieniem sieci zewnątrzkomórkowych, zbudowanych z DNA mitochondrialnego, jednak ich funkcja w zakażeniach nie została do końca poznana [57]. Dowiedziano jedynie [13,56,57], że uwolnienie chromatyny mitochondrialnej zarówno granulocytów obojętnochłonnych, jak i kwasochłonnych, nie prowadzi do śmierci tych komórek, a uwalnianie jej następuje znacznie szybciej niż w przypadku uwalniania sieci pochodzenia jądrowego, jednak podobnie jak przy uwolnieniu zawartości jądra komórkowego podczas tworzenia sieci NET, w obu przypadkach zależne jest od reaktywnych form tlenu. W ostatnim czasie do grupy komórek uwalniających chromatynowe sieci zewnątrzkomórkowe dołączyły makrofagi i monocyty. W 2010 r. Chow i wsp. [9] opisać u myszy subpopulację makrofagów – RAW 264.7, które po stymulacji PMA zdolne były do wytworzenia zewnątrzkomórkowych sieci, nazwanych przez autorów MET (macrophage extracellular traps), których uwolnienie, podobnie jak w przypadku neutrofilów i mastocytów, prowadzi do śmierci tych komórek. Kolejne badania [2] potwierdziły te obserwacje, jako że stwierdzono to zjawisko w makrofagach pęcherzykowych u bydła w odpowiedzi na zakażenie *Mannheimia haemolytica* i wytwarzaną przez nie leukotoksynę oraz w makrofagach ludzkich linii THP-1, w odpowiedzi na hemolizynę *E. coli*. W przypadku monocytów – komórek żyjących krótko i bardzo podatnych na konstytutywną, kaspazozależną apoptozę, stwierdzono, że zjawisko uwalniania zewnątrzkomórkowych sieci chromatynowych wraz z histonami zachodzi w reakcji na zakażenie bakteriami *Escherichia coli* oraz *Klebsiella pneumoniae* w sposób zależny od kaspazy 1 i wiąże się z liczbą komórek bakteryjnych we krwi [53].

ZJAWISKO NETOZY

W pierwszej publikacji [7], dotyczącej uwalniania sieci NET przez neutrofile stwierdzono, że ta bogata w histony struktura uwalniana jest wyłącznie ze zdrowych, nieszkodzonych komórek. W kolejnych latach ta sama grupa badaczy [14], na podstawie analizy pojedynczych komórek, zaobserwowała uwalnianie NET z neutrofilów wchodzących w nowo odkryty program śmierci komórkowej, nazwanej później NETozą [46]. NEToza jest procesem pobudzonym nie tylko przez patogeny i ich elementy, ale także przez IL-8, TNF- α , PMA, aktywowane trombocyty oraz przeciwciała przeciwneutrofilowe wyizolowane od pacjentów z zapaleniem małych naczyń [20,46]. Wykazano, że te ostatnie przeciwciała są także wytwarzane w przebiegu takich chorób, jak toczeń rumieniowaty układowy czy malaria, co sugeruje, że w czasie przebiegów tych stanów chorobowych, może również dochodzić do stymulacji procesu NETozy [24,42]. Ta postać śmierci różni się od nekrozy czy apoptozy, ponieważ w chwili rozpoczęcia procesu NETozy zmienia się w neutrofilach struktura cytoplazmy, w której dochodzi do wymieszania się chromatyny jądrowej i uwolnionych z ziarnistości tych komórek substancji

bójących [14]. Nie obserwuje się w czasie tego zjawiska typowych dla apoptozy zmian morfologicznych, takich jak pofałdowanie błony komórkowej, kondensacja chromatyny jądrowej, eksternalizacja fosfatydyloseryny (PS) przed fragmentacją błony plazmatycznej czy internukleosomalne cięcia DNA [14]. Ponadto aktywność kaspaz, charakterystyczna dla apoptozy, nie jest notowana podczas indukowanej PMA NETozy [14]. Co więcej, kinetyka indukowanej PMA NETozy nie zmienia się po potraktowaniu inhibitorem kaspaz, jakim jest Z-VAD [41]. Także dodanie nekrostatyny 1, hamującej aktywność kinazy treoninowo-serynowej RIP1 (receptor-interacting protein-1 – RIPK1), prowadzącej do śmierci komórek w wyniku nekrozy, nie wpływa na NETozę [41]. Natomiast morfologiczne podobieństwo NET i fibryny (włókniste białko naturalnie występujące we krwi i biorące udział w krzepnięciu) bardzo utrudnia rozróżnienie tych struktur *in vivo* w obrazie uzyskanym metodą skaningowej mikroskopii elektronowej [22]. Wynika to z tego, że w chwili infekcji, poprzedzonej uszkodzeniem śródbłonna, neutrofile wraz z czynnikami krzepnięcia krwi kumulują się w miejscu uszkodzenia, a dodatkowo mogą przylegać do fibryny [23]. Wykazano, że obie struktury – tak NET, jak i fibryna – podatne są na niszczenie przez DNazę I [22], dlatego też nawet po podaniu ich działaniu tego enzymu, rozróżnienie NET i powstałych grudek pociętej fibryny jest niemożliwe. Stąd przyjmuje się, że stosowanie *in vivo* mikroskopii fluorescencyjnej oraz analizy immunohistochemicznej z użyciem transmisyjnej mikroskopii elektronowej jest niemal niezbędne do ich rozróżnienia. Trzeba dodać, że mimo iż wiele mechanizmów towarzyszących NETozie pozostaje niewyjaśnionych, coraz więcej wskazuje na to, że rozpad otoczki jądrowej oraz dekondensacja chromatyny zależy od współdziałania trzech procesów, to jest cytrulinacji (deiminacji) histonów, uwolnienia reaktywnych form tlenu oraz autofagii [7,14,35,36,41,51].

CYTRULINACJA (DEIMINACJA) HISTONÓW A NETOZA

Wykazano, że upakowanie chromatyny jądrowej związane z obecnością histonów oraz jej dekondensacja jest po części zależna od odpowiedniej modyfikacji tych białek. Dowiedziono, że histony podlegają wielu modyfikacjom potranslacyjnym, z których istotną dla NETozy jest deiminacja (cytrulinacja) reszt guanidynowych arginin w histonach H2A, H3 oraz H4 [36], która prowadzi do przekształcenia argininy (Arg) w niestandardowy aminokwas cytrulinę (Cit). Proces ten polega na konwersji dodatnio naładowanych bocznych łańcuchów argininowych w polarne i pozbawione ładunku reszty cytrulinowe. Znanych jest 5 izoform deiminazy peptydyloargininy (PAD), które zdolne są do przeprowadzenia takiej deiminacji, z których PAD4 jest postacią najczęściej opisywaną [42]. Wszystkie deiminazy peptydyloargininowe są zależne od Ca^{2+} , jednak tylko PAD4 zawierają sygnał lokalizacji jądrowej (NLS – nuclear localization signal), który umożliwia translokację tego enzymu do jądra. Modyfikacje histonów podlegające PAD4 regulują przede wszystkim strukturę chromatyny i ekspresję genów w wielu komórkach [36], choć enzym ten nie odgrywa roli w reakcji neutrofilów i eozynofików na infekcję. W komórkach tych PAD4 znajduje się w dużych ilościach w ziarnistościach [36], a jego aktywacja prowadzi do rozległej deiminacji histonów. Po raz pierwszy zaobserwowano to podczas badań na komórkach

HL-60, zdolnych do spontanicznego lub stymulowanego różnicowania się w inne komórki, które pod wpływem dimetylosulfotlenku (DMSO) lub kwasu retinowego (ATRA – all-trans retinoic acid) różnicowały się w dojrzałe neutrofile [36,51]. Przeprowadzone na nich badania wykazały, że czynniki prozapalne, takie jak LPS, IL-8, fMLP (N-formylo-metionilo-leucyno-fenylalanina) czy bakterie *Shigella flexneri*, powodują znaczny wzrost cytrulinacji histonu H3 [36, 51]. Neeli i wsp. [36] oraz Wang i wsp.[51], prowadzący badania nad wpływem deiminacji na wytwarzanie NET przez przeróżnicowane w neutrofile komórki HL-60, wysunęli wniosek, iż zahamowanie aktywności PAD4 blokuje uwalnianie NET przez te komórki, indukowane jonoforem wapniowym lub *Shigella flexneri*. Badania te wykazały również, że ilość NET wytwarzana *in vitro* przez neutrofile powstałe z linii komórek HL-60, była niewielka w porównaniu do ilości uwalnianej *in vivo* przez dojrzałe, aktywowane neutrofile, mimo iż w obu przypadkach zaobserwowano cytrulinację histonu H3. Wskazuje to, że cytrulinacja jest ważnym, ale niewystarczającym elementem regulującym NETozę i konieczne jest uruchomienie dodatkowych mechanizmów, dzięki którym możliwe jest formowanie się sieci NET.

REAKTYWNE FORMY TLENU A NETOZA

Do niedawna przyjmowano, że do uwolnienia chromatyny do przestrzeni komórkowej niezbędne jest wytworzenie reaktywnych form tlenu (ROS) [14]. Obecnie, dzięki lepszemu poznaniu molekularnych podstaw wytwarzania sieci NET zaobserwowano, że możliwe jest wytworzenie NET także bez udziału ROS [20], choć w większości przypadków ROS są konieczne do jej powstania, chociażby w indukcji tego zjawiska przez PMA [7,14]. Wykazano, że właściwie pobudzone neutrofile aktywują kompleks enzymatyczny – oksydazę NADPH, wskutek czego powstają ogromne ilości nadtlenu, zaś zahamowanie oksydazy NADPH oraz zakłócenie równowagi procesów utleniania i redukcji za pomocą środków farmakologicznych, np. jodonianu dwufenylowego (DPI – diphenyleneiodonium), blokuje zupełnie uwolnienie sieci NET indukowanej PMA [14]. Dowiedziono także, że wytwarzanie NET indukowane PMA jest niemożliwe u osób chorych na przewlekłą chorobę ziarniniakową (CGD – chronic granulomatous disease), u których mutacja któregośkolwiek z czterech genów kodujących podjednostki oksydazy NADPH uniemożliwia zarówno wytwarzanie sieci NET, jak i niszczenie bakterii w fagolizosomach podczas procesu fagocytozy [42,46]. Neutrofile u tych osób odzyskują jednak możliwość wytwarzania NET po inkubacji z oksydazą glukozową, generującą powstawanie nadtlenu wodoru. Trzeba jednak zaznaczyć, że oksydaza glukozowa wykorzystana do indukcji NETozy w opisanym doświadczeniu [14], pochodziła z grzybów *Aspergillus* sp., których obecność wywołuje NETozę bezpośrednio, stąd nie można wykluczyć, że wzorce molekularne związane z tymi patogenami (PAMP – pathogen associated molecular patterns) – potencjalnie zanieczyszczające enzym, nie wpłynęły stymulująco na ten proces [4,5,14,43]. Uwalnianie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych w przytoczonych badaniach dotyczących granulocytów obojętnochłonnych odgrywa bardzo ważną rolę, gdyż sam proces fagocytozy tych komórek jest nieskuteczny w przypadku większych cząsteczek, jakimi są np. grzyby [5,47,48]. Wiadomo, że osoby chore na CGD

często cierpią z powodu zakażeń oportunistycznych wywołanych właśnie grzybami – o wiele większymi np. od bakterii i mimo to, że proces bójczy jest u nich raczej wzmoczony niż obniżony, niszczenie większych drobnoustrojów (grzybów) w wyniku fagocytozy jest niemożliwe. Stwierdzono, że skuteczność przeciwgrzybiczna neutrofilów oparta jest w tym przypadku na zdolności do wytwarzania sieci NET oraz na działaniu kalprotektyny, co prowadzi do niszczenia grzybów z rodzaju *Aspergillus* sp., które u chorych na CGD wywołują zapalenie płuc i są jednym z głównych powodów ich śmierci [5]. Analogiczny stan można osiągnąć u ludzi w wyniku terapii genowej, przywracając aktywność oksydazy NADPH w neutrofilach [5]. Podobny mechanizm, jak przy niszczeniu *Aspergillus* sp., tj. poprzez wytwarzanie sieci NET i działanie kalprotektyny, opisano w przypadku zakażenia ludzi *Candida albicans* [47,48]. NEToza, jak wspomniano wcześniej, wydaje się śmiercią komórki niezależną od kaspaz, a reaktywne formy tlenu, wytworzone z udziałem oksydazy NADPH, zdają się hamować ich aktywność [12, 54]. W badaniach prowadzonych przez Fadeela i wsp. [12], dotyczących wpływu reaktywnych form tlenu na aktywność kaspaz i konstytutywną apoptozę neutrofilów oraz apoptozę związaną z Fas/APO-1, zastosowanie DPI (nieswoistego inhibitora oksydazy NADPH) spowodowało znaczny wzrost poziomu kaspaz w wyizolowanych z krwi granulocytach obojętnochłonnych, a także zwiększenie ekspresji fosfatydyloseryny na powierzchni tych komórek – charakterystycznego elementu ich śmierci w procesie apoptozy. Z kolei aktywacja neutrofilów poprzez PMA, prowadząca do wybuchu tlenowego i wytworzenia dużej ilości ROS, doprowadziła do zahamowania aktywności kaspaz w tych komórkach, a dodatkowo odnotowano zmiany morfologiczne neutrofilów w postaci zwiększenia ich rozmiarów i silnej wakuolizacji cytoplazmy, a także zmiany inne niż podczas apoptozy konstytutywnej lub stymulowanej Fas/APO-1 [12]. Zahamowanie kaskady aktywacji kaspaz zaobserwowano także wskutek wybuchu tlenowego, wywołanego procesem fagocytozy *S. aureus* [54]. Można zatem przyjąć, że reaktywne formy tlenu mogą potencjalnie stymulować NETozę przez blokowanie apoptozy zależnej od kaspaz [12,54], choć hamowanie apoptozy może się też odbywać pośrednio poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [33]. Warto dodać, iż stymulatory prozapalne, takie jak LPS czy IL-8, znane z pobudzania NETozy, nie zwiększają aktywności oksydazy NADPH w neutrofilach, a jedynie uwrażliwiają te komórki na wybuch oksydacyjny w tzw. primingu, czyli wstępnym pobudzeniu komórki, przygotowującego ją do danej reakcji lub modyfikującego dalszy jej przebieg [6,17,42]. Może to tłumaczyć dlaczego tylko w niektórych przypadkach po stymulacji LPS czy IL-8, zaobserwowano formowanie się NET, a w innych jedynie spowolnienie apoptozy, bez wytworzenia NET. Aktywność oksydazy NADPH w granulocytach obojętnochłonnych może być także modyfikowana zjawiskiem primingu wywołanym przez inne, poza LPS i IL-8, czynniki prozapalne, takie jak GM-CSF czy TNF- α , co skutkuje uwrażliwieniem neutrofilów na wtórne czynniki inicjujące w tej sytuacji silniejszy wybuch tlenowy, takie jak fMLP czy PMA [17]. Aktywacja oksydazy NADPH przez różne czynniki, w tym PMA czy fMLP, stymuluje fosforylację jej cytoplazmatycznych podjednostek – $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ oraz ich translokację do błony plazmatycznej komórki, gdzie oddziałują ze znajdującym

się tam flawocytochromem b_{558} , składającym się z dwóch podjednostek: $gp91^{phox}$ – określanej obecnie jako Nox2, oraz $p22^{phox}$. Dodatkowo, wchodzące w skład kompleksu oksydazy NADPH białko Rac2, należące do rodziny białek Rho, odłącza się od swojego inhibitora – RhoGDI (RhoGDP dyssociation inhibitor) i oddziałuje z flawocytochromem b_{558} , tworząc miejsce wiązania dla podjednostek cytoplazmatycznych oksydazy NADPH, a której kompletne „złożenie”, warunkuje jej prawidłowe funkcjonowanie i wytwarzanie reaktywnych form tlenu i związane z tym uwalnianie sieci NET [17]. Potwierdzają to m.in. badania, przeprowadzone w ostatnim czasie przez Lima i wsp. [25], które wykazały, że zahamowanie białka Rac2, uniemożliwia wytworzenie sieci zewnątrzkomórkowych, przy czym komórki te odzyskiwały tę zdolność dzięki zewnątrzpochodnym źródłom reaktywnych form tlenu. Hamowanie Rac2 spowodowało także obniżenie wytwarzania tlenku azotu (NO – nitric oxide), który również wydaje się konieczny do powstania sieci NET, jako że zastosowanie inhibitora syntazy tlenku azotu – L-NAME (NG-nitro-L-arginine methyl ester), także wiązało się z zahamowaniem wytwarzania tych sieci [25]. Zarejestrowano, że ROS aktywują także proteazy serynowe podczas procesu fagocytozy, a te również wchodzą w skład NET, stąd przypuszczalnie mają działanie przeciwbakteryjne lub modulujące właściwości bójcze innych składników NET [42]. Wykazano również, że uwalniane z ziarnistości azurofilnych komórek PMN elastaza neutrofilowa (NE – neutrophil elastase) oraz mieloperoksydaza (MPO), sprzyjają dekondensacji chromatyny [31,37]. NE cechuje zdolność do degradacji histonów, z czego najskuteczniej niszczone jest struktura histonu H4, jednak jej zbyt wysokie stężenie może hamować proces dekondensacji [37]. MPO, która jest niezbędna do wytworzenia sieci NET, do swojej aktywności rozluźniającej chromatynę jądrową wymaga obecności NE, ale nie wpływa na jej zdolność do degradacji histonów [31,37]. Zauważono także, że stopień dekondensacji chromatyny w obecności MPO jest wprost proporcjonalny do jej stężenia i zachodzi bez udziału H_2O_2 , co sugeruje nieenzymatyczny charakter tej reakcji [37]. Według Marcosa i wsp. [29], proces formowania się sieci NET, nie jest uzależniony wyłącznie od ROS. Na podstawie badań przeprowadzonych na próbkach z dróg oddechowych ludzi chorych na mukowiscydozę udowodniono udział w procesie formowania się sieci NET sprzężonych z białkiem G receptorów CXCR2 [29]. Nie stwierdzono natomiast udziału w tym procesie ROS [29]. Wydaje się więc, że reaktywne formy tlenu, podobnie jak cytrulinacja histonów, to bardzo ważny, ale nie jedyny element NETozy. Hipotezę tę potwierdzono także w innych badaniach [41], gdzie inkubacja neutrofilów z niewielkimi, milimolarnymi stężeniami nadtlenu wodoru, prowadziła tylko do indukcji apoptozy, ale nie NETozy. Także stymulacja neutrofilów fMLP – potencjalnym induktorem aktywności oksydazy NADPH, nie pobudza NETozy [41,47]. Dodatkowo wykazano, że neutrofile izolowane z krwi obwodowej noworodków, w przeciwieństwie do neutrofilów osób dorosłych, nie wytwarzają NET, mimo iż ROS są wytwarzane w taki sam sposób w obu przypadkach [55]. Warto też dodać, iż we wspomnianych wcześniej, przeróżnicowanych komórkach HL-60, dochodzi zarówno do cytrulinacji histonów, jak i wytwarzania ROS, jednak znikoma ilość wytworzonej przez nie sieci NET sugeruje, że może to mieć związek z zaburzeniem procesu autofagii tych komórek.

AUTOFAGIA A NETOZA

Od czasu odkrycia i opisanie sieci NET, główną dla tego procesu rolę przypisywano deiminacji (cytrulinacji) histonów oraz wytwarzaniu ROS. Tymczasem w 2010 r. Remijnsen i wsp. [41], na podstawie badań z użyciem nieswoistego inhibitora autofagii – wortmaniny (wortmannin) dowiedli, iż zajęcie NETozy w neutrofilach indukowanych PMA wymaga nie tylko prawidłowego przebiegu aktywacji oksydazy NADPH, ale także zdolności neutrofilów do przeprowadzania procesu autofagii. Udział tego ostatniego procesu zaobserwowali także Fuchs i wsp. [14], którzy wykazali silną wakuolizację cytoplazmy w początkowych stadiach formowania się sieci NET, wynikającą z powstania w komórkach PMN licznych autofagosomów. Obraz związany z wakuolizacją cytoplazmy zaobserwowano także w neutrofilach stymulowanych PMA u osób chorych na CGD, a które nie były zdolne do wytwarzania ROS [41]. Badania te potwierdziły, że farmakologiczne zahamowanie procesu autofagii nie koliduje z zajęciem wybuchu tlenowego zależnego od oksydazy NADPH, chociaż stan ten zaburza proces wewnątrzkomórkowej dekondukcji chromatyny, co prowadzi do śmierci komórki z objawami apoptozy. Wykazano także [41], że zahamowanie oksydazy NADPH nie wpływa na proces autofagii, jednak zaburzenia w przebiegu któregośkolwiek z tych dwóch mechanizmów blokują dekondukcję chromatyny jądrowej, a tym samym NETozę. [41]. Badając wpływ interleukiny 1 β (IL-1 β) oraz procesu autofagii na wytwarzanie sieci NET u osób chorych na dnę moczanową, wykazano silną zależność między hamowaniem 3-kinazy fosfatidyloinozytolu (PI3K – phosphatidylinositol 3-kinase) i zakwaszeniem środowiska pęcherzyków endosomalnych a zahamowaniem tworzenia i uwalniania sieci NET [32]. W badaniach tych zastosowanie 3-metyloadeniny (3-MA – 3-methyladenine) i LY 294002 (swoistych inhibitorów PI3K – kinazy kluczowej dla rozpoczęcia procesu autofagii) oraz bafilomycyny A (blokującej zakwaszenie pęcherzyków endosomalnych w jej końcowym etapie), skutkowało brakiem wytwarzania NET, które wydaje się stymulowane obecnością kryształów moczanu jednosodowego (MSU – monosodium urate), dodatkowo regulujących przekształcenie prointerleukiny 1 β (pro-IL1 β) w postać dojrzałą – IL-1 β , na drodze niezależnej od kaspazy 1 [58].

MECHANIZMY OBRONY PATOGENÓW WOBEC SIECI NET

Skuteczność sieci NET potwierdzono wobec wielu mikroorganizmów i pasożytów, jednak wykazano, że niektóre z nich potrafią skutecznie bronić się przed złapaniem i/lub, jak już wspomniano, zniszczeniem ich przez tę sieć. Jednym z takich mechanizmów jest modyfikacja budowy ściany komórkowej, skutek czego zmniejsza się jej powinowactwo do NET, innym zaś zmiana ładunku ich powierzchni [3,8,52]. Dotychczas nie badano determinantów warunkujących wiązanie drobnoustrojów przez NET, jednak dowiedziono, że jest to zależne od składników znajdujących się na powierzchni komórek bakteryjnych [30,52]. Na przykład paciorkowce mają przynajmniej dwie strategie, dzięki którym unikają związania przez sieć NET i obie oparte są na modyfikacji powierzchni komórki bakteryjnej. Jedną z nich bazuje na zmniejszeniu powinowactwa NET do powierzchni komórki, co związane jest z polisacharydową otoczką tych bakterii, gdyż wykazano, że

w przypadku *S. pneumoniae*, jakkolwiek zmiana w ekspresji genów warunkujących określoną strukturę otoczki znacząco zmniejsza wiązanie tych bakterii przez sieć NET [3]. Dodatkowo, aktywacja operonu *dlt* (*d*-alanyl-lipoteichoic acid) występującego w genomie tych bakterii, powoduje włączenie reszt *D*-alaniny do kwasów lipoteichoicznych, zmieniając w ten sposób ładunek ich ściany komórkowej z ujemnego na dodatni, co zmniejsza powinowactwo kationowych, bakteriobójczych białek, wchodzących w skład NET, do tych komórek [52]. Trzeba dodać, że inaktywacja *dltA* (jeden z genów, obok *dltB*, *dltC* i *dltD*, wchodzących w skład operonu *dlt*) nie ma znaczącego wpływu na wiązanie bakterii przez sieć NET do czasu, gdy mikroorganizmy chroni polisacharydowa otoczka, jednakże jej brak powoduje znaczący wzrost podatności drobnoustrojów na działanie tych sieci [52]. Innym, bardzo powszechnym i lepiej poznanym mechanizmem obronnym mikroorganizmów przed siecią NET, jest wytwarzanie DNaz – enzymów niszczących DNA, to jest głównego elementu strukturalnego sieci NET. Zjawisko to obserwuje się u bakterii *Streptococcus* grupy A (GAS) oraz u wspomnianego wcześniej *S. pneumoniae* [3,8]. W przypadku tych ostatnich bakterii, po związaniu ich przez sieć NET następuje ekspresja genu *endA* – kodującego endonukleazę A (EndA), która wywołuje degradację uwolnionego z komórki DNA. Dodatkowo, obecność EndA stymuluje uwalnianie przez granulocyty obojętnochłonne elastazy, co dowodzi, że endonukleaza nie tylko niszczy strukturę NET, ale także zaburza integralność całej komórki granulocytu [3]. Prowadzone przez Beitera i wsp. [3] badania wykazały, że uwolnienie endonukleazy A w odpowiedzi na NET jest także pewnego rodzaju czynnikiem wirulencji, przeciwdziałającym uwięzieniu przez sieć NET i wzmacniającym dodatkowo rozprzestrzenianie się *S. pneumoniae* do płuc i dalej do układu krążenia. W przypadku GAS, NET niszczone jest przez DNazę SdaI (DNaza wytwarzana przez patogeny GAS), kodowaną przez gen *sdaI*, co zwiększa przeżywalność i „zjadliwość” patogenów, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [8]. Przeprowadzone przez Buchanana i wsp. [8] badania sugerują, że zastosowanie inhibitorów DNaz, takich jak aktywna G, przywraca granulocytom obojętnochłonnym zdolność do skutecznego „wyłapywania” i unieszkodliwienia niektórych patogenów, w tym także GAS, za pomocą NET. Przyjmuje się, że w przyszłości stosowanie takich inhibitorów może, w przypadku niektórych chorób, stanowić alternatywę dla kuracji antybiotykami czy nawet zabiegów chirurgicznych [8].

NEGATYWNE SKUTKI DZIAŁANIA NET

Rola zjawiska uwalniania NET przez komórki PMN oraz sieci zewnątrzkomórkowych wytwarzanych przez inne komórki jest bardzo ważna np. w reakcjach odporności wrodzonej, gdyż wiadomo, że zaburzenie zdolności ich wytwarzania przyczynia się do wzrostu podatności gospodarza na infekcje oraz rozwoju wielu chorób. Trzeba jednak zaznaczyć, że duże ilości NET uwalniane w stanach patologicznych, które nie mogą być efektywnie usuwane przez DNazy, a także ich akumulacja w narządach i naczyniach, których degradacja z udziałem DNaz prowadzi do uwolnienia związanych z nią białek, mogą doprowadzić do stanu zapalnego lub go nasilić, zaburzyć mikrokrążenie i powodować uszkodzenie tkanek. Uwolnienie dużych ilości DNA, histonów oraz białek magazynowanych w komórkach może

się także przyczynić do rozwoju chorób autoimmunizacyjnych. Przykładem takiego schorzenia jest toczeń rumieniowaty układowy (SLE – systemic lupus erythematosus), podczas którego gospodarz wytwarza przeciwciała przeciw własnemu DNA oraz jego kompleksom z bakteriobójczymi peptydami [24]. Obecność tych przeciwciał, wraz z charakterystyczną dla tej choroby nadekspresją katelicydyny, stymuluje neutrofile do uwalniania NET, zawierającego DNA, co dodatkowo nasila stan zapalny [24,26]. Udział zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych zaobserwowano także w przebiegu zapalenia małych naczyń (SVV – small vessels vasculitis), podczas którego pobudzenie wytwarzania NET związane jest z obecnością we krwi przeciwciał przeciwneutrofilowych (ANCA – antineutrophil cytoplasm autoantibodies) [21], a powstające sieci, odkładające się w nerkach, oraz krążące we krwi kompleksy DNA-MPO, sprzyjają nasilaniu się stanu zapalnego naczyń oraz reakcji autoimmunologicznej wobec elementów neutrofilów. Wykazano także [20], że aktywowane podczas stanów zapalnych komórki śródbłonka (EC – endothelial cells), uczestniczące w transmigracji komórek PMN, mogą w pewnym stopniu stymulować tworzenie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych poprzez wydzielanie IL-8, które z kolei powodują uszkodzenie śródbłonka prawdopodobnie zależnie od cytotoksycznych właściwości histonów i innych białek wchodzących w ich skład, zwrótnie nasilając stan zapalny [44]. Zaobserwowano także, że przypadku osób chorych na raka, cukrzycę, po przeszczepach, a także w stanie przedrzucawkowym czy po przebytych udarze, zaobserwowano we krwi tych chorych krążenie wolnego DNA (cf-DNA – circulating-free DNA) [26]. Do niedawna uważano, że pochodzi ono głównie z obumarłych, nekrotycznych tkanek, jednak odkrycie sieci NET, których podstawowym elementem strukturalnym jest właśnie DNA, przyczyniło się do podjęcia dodatkowych badań. Obserwacje z tego zakresu m.in. u ciężarnych kobiet w stanie przedrzucawkowym wykazały nie tylko wysokie ciśnienie tętnicze oraz obecność białka w moczu, ale także wzmożoną aktywację neutrofilów krwi obwodowej oraz wzrost stężenia wolnego, matczyngo DNA we krwi [19]. U kobiet dotkniętych tym schorzeniem wykazano także obecność sieci NET w przestrzeniach międzykosmkowych [19], co sugeruje, że zjawisko uwalniania NET przez neutrofile może leżeć u podstaw etiologii tego schorzenia. Szkodliwe działanie związane z wytworzonymi NET obserwuje się także w przypadku chorób

infekcyjnych oraz genetycznych, m.in. wielu chorób układu oddechowego. Zauważono, że u chorych na ostre uszkodzenie płuc, będące powikłaniem wirusowego zapalenia płuc, zewnątrzkomórkowe sieci neutrofilowe gromadzą się w okolicach pęcherzyków płucnych i prawdopodobnie są jednym z powodów uszkodzeń pęcherzykowo-naczyniowych, wynikających m.in. ze wspomnianych właściwości cytotoksycznych niektórych z białkowych składników tych sieci [34,44]. W przypadku pacjentów cierpiących na mukowiscydozę wykazano, że zawarta w ich płwocinie elastaza oraz DNA zdają się również pochodzić z NET, co sugeruje, że w tym przypadku odkładanie się sieci NET może nasilać objawy choroby zarówno przez zahamowanie ruchów rzęskowych i tym samym mechanicznego oczyszczenia dróg oddechowych, ale także przez okluzję naczyń włosowatych płuc [26,52].

PODSUMOWANIE

Powszechnie występujące we krwi neutrofile pełnią bardzo ważną rolę w mechanizmach wrodzonej odporności u kręgowców, będąc w chwili infekcji pierwszą linią obrony organizmu, opartą na procesie fagocytozy, ale i/lub cytotoksyczności, cytolizy i pinocytozy. Obecnie odkryto inną, bardzo ważną cechę tych komórek, to jest zdolność do uwalniania chromatynowej sieci NET, utworzonej m.in. z DNA jądrowego, która pozwala „schwytać” i „uwięzić” patogeny, wystawiając je na działanie stężonych i silnie bójczych białek pochodzących z ziarnistości neutrofilów. Ponadto przerwanie ciągłości otoczki jądrowej, a następnie błon ziarnistości i błony cytoplazmatycznej, wiąże się z wejściem tych komórek w program śmierci nazwanej NETozą. Dodatkowo zdolność innych komórek układu odpornościowego, w tym mastocytów i makrofagów/monocytów, do uwalniania zewnątrzkomórkowych sieci chromatynowych pochodzenia jądrowego, a także neutrofilów i eozynofiliów do wyrzucania sieci powstałych z chromatyny mitochondrialnej, wydaje się przełomem w badaniach nad mechanizmami odporności wrodzonej. Mimo iż skład sieci NET, a także ET uwalnianych przez inne komórki oraz sposób ich uwalniania zostały opisane, molekularne mechanizmy towarzyszące ich wyrzuceniu nadal nie są do końca poznane i wciąż są przedmiotem badań, co być może w przyszłości przyczyni się do bliższego poznania dalszych, swoistych dla tych procesów faktów, stanowiących ważne elementy odporności u kręgowców.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Amulic B., Hayes G.: Neutrophil extracellular traps. *Curr. Biol.*, 2011; 21: R297–R298
- [2] Aulik N.A., Hellenbrand K.M., Czuprynski C.J.: *Mannheimia haemolytica* and its leukotoxin causes macrophage extracellular trap formation by bovine macrophages. *Infect. Immun.*, 2012; 80: 1923–1933
- [3] Beiter K., Wartha F., Albigier B., Normark S., Zychlinsky A., Henriques-Normark B.: An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr. Biol.*, 2006; 16: 401–407
- [4] Bianchi M., Hakkim A., Brinkmann V., Siler U., Seger R.A., Zychlinsky A., Reichenbach J.: Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*, 2009; 114: 2619–2622
- [5] Bianchi M., Niemiec M.J., Siler U., Urban C.F., Reichenbach J.: Restoration of anti-*Aspergillus* defense by neutrophil extracellular traps in human chronic granulomatous disease after gene therapy is calprotectin-dependent. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2011; 127: 1243–1252.e7
- [6] Brécharde S., Bueb J.L., Tschirhart E.J.: Interleukin-8 primes oxidative burst in neutrophil-like HL-60 through changes in cytosolic calcium. *Cell Calcium*, 2005; 37: 531–540
- [7] Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A.: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004; 303: 1532–1535
- [8] Buchanan J.T., Simpson A.J., Aziz R.K., Liu G.Y., Kristian S.A., Kotb M., Feramisco J., Nizet V.: DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr. Biol.*, 2006; 16: 396–340
- [9] 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.: Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps. *Cell Host Microbe*, 2010; 8: 445–454
- [10] Clark S.R., Ma A.C., Tavener S.A., McDonald B., Goodarzi Z., Kelly M.M., Patel K.D., Chakrabarti S., McAvoy E., Sinclair G.D., Keys E.M., Allen-Vercoe E., Devinney R., Doig C.J., Green F.H., Kubers P.: Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.*, 2007; 13: 463–469
- [11] Deptuła W., Tokarz-Deptuła B., Stosik M.: *Immunologia dla biologów*. Wyd. US, Szczecin 2008

- [12] Fadeel B., Ahlin A., Henter J.I., Orrenius S., Hampton M.B.: Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. *Blood*, 1998; 92: 4808–4818
- [13] Fossati G., Moulding D.A., Spiller D.G., Moots R.J., White M.R., Edwards S.W.: The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis. *J. Immunol.*, 2003; 170: 1964–1972
- [14] Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A.: Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.*, 2007; 176: 231–241
- [15] Gabriel C., McMaster W.R., Girard D., Descoteaux A.: *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. *J. Immunol.*, 2010; 185: 4319–4327
- [16] Galluzzi L., Vitale I., Abrams J.M., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., Dawson T.M., Dawson V.L., El-Deiry W.S., Fulda S., Gottlieb E., Green D.R., Hengartner M.O., Kepp O., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Lu X., Madeo F., Malorni W., Mehlen P., Nunez G., Peter M.E., Piacentini M., Rubinsztein D.C., Shi Y., Simon H.U., Vandenabeele P., White E., Yuan J., Zhivotovskiy B., Melino G., Kroemer G.: Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.*, 2012; 19: 107–120
- [17] Guichard C., Pedruzzi E., Dewas C., Fay M., Pouzet C., Bens M., Vandewalle A., Ogier-Denis E., Gougerot-Pocidallo M.A., Elbim C.: Interleukin-8-induced priming of neutrophil oxidative burst requires sequential recruitment of NADPH oxidase components into lipid rafts. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 37021–37032
- [18] Guimarães-Costa A.B., Nascimento M.T., Froment G.S., Soares R.P., Morgado F.N., Conceição-Silva F., Saraiva E.M.: *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009; 106: 6748–6753
- [19] Gupta A., Hasler P., Gebhardt S., Holzgreve W., Hahn S.: Occurrence of neutrophil extracellular DNA traps (NETs) in pre-eclampsia: a link with elevated levels of cell-free DNA? *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2006; 1075: 118–122
- [20] Gupta A.K., Joshi M.B., Philippova M., Erne P., Hasler P., Hahn S., Resnik T.J.: Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett.*, 2010; 584: 3193–3197
- [21] Kessenbrock K., Krumbholz M., Schönemärck U., Back W., Gross W.L., Werb Z., Gröne H.J., Brinkmann V., Jenne D.E.: Netting neutrophils in autoimmune small-vessels vasculitis. *Nat. Med.*, 2009; 15: 623–625
- [22] Krautgartner W.D., Klappacher M., Hannig M., Obermayer A., Hartl D., Marcos V., Vitkov L.: Fibrin mimics neutrophil extracellular traps in SEM. *Ultrastruct. Pathol.*, 2010; 34: 226–231
- [23] Kuijper P.H., Gallardo Torres H.I., van der Linden J.A., Lammers J.W., Sixma J.J., Zwaginga J.J., Koenderman L.: Neutrophil adhesion to fibrinogen and fibrin under flow conditions is diminished by activation and L-selectin shedding. *Blood*, 1997; 89: 2131–2138
- [24] Lande R., Ganguly D., Facchinetti V., Frasca L., Conrad C., Gregorio J., Meller S., Chamilos G., Sebasigari R., Ricciari V., Bassett R., Amuro H., Fukuhara S., Ito T., Liu Y.J., Gilliet M.: Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.*, 2011; 3: 73ra19
- [25] Lim M.B., Kuiper J.W., Katchky A., Goldberg H., Glogauer M.: Rac2 is required for the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Leukoc. Biol.*, 2011; 90: 771–776
- [26] Lögters T., Margraf S., Altrichter J., Cinatl J., Mitzner S., Windolf J., Scholz M.: The clinical value of neutrophil extracellular traps. *Med. Microbiol. Immunol.*, 2009; 198: 211–219
- [27] Ma A.C., Kubes P.: Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis. *J. Thromb. Haemost.*, 2008; 6: 415–420
- [28] Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C., Jaillon S.: Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011; 11: 519–531
- [29] Marcos V., Zhou Z., Yildirim A.O., Bohla A., Hector A., Vitkov L., Wiedenbauer E.M., Krautgartner W.D., Stoiber W., Belohradsky B.H., Rieber N., Kormann M., Koller B., Roscher A., Roos D., Griese M., Eickelberg O., Döring G., Mall M.A., Hartl D.: CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nat. Med.*, 2010; 16: 1018–1023
- [30] Medina E.: Neutrophil extracellular traps: a strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host. *J. Innate Immun.*, 2009; 1: 176–180
- [31] Metzler K.D., Fuchs T.A., Nauseef W.M., Reumaux D., Roesler J., Schulze I., Wahn V., Papayannopoulos V., Zychlinsky A.: Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood*, 2011; 117: 953–959
- [32] Mitroulis I., Kambas K., Chrysanthopoulou A., Skendros P., Apostolidou E., Kourtzelis I., Drosos G.I., Boumpas D.T., Ritis K.: Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1 β and autophagy-related signaling in gout. *PLoS One*, 2011; 6: e29318
- [33] Morgan M.J., Liu Z.G.: Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res.*, 2011; 21: 103–115
- [34] Narasaraju T., Yang E., Samy R.P., Ng H.H., Poh W.P., Liew A.A., Phoon M.C., van Rooijen N., Chow V.T.: Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *Am. J. Pathol.*, 2011; 179: 199–210
- [35] Neeli I., Dwivedi N., Khan S., Radic M.: Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *J. Innate Immun.*, 2009; 1: 194–201
- [36] Neeli I., Khan S.N., Radic M.: Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *J. Immunol.*, 2008; 180: 1895–1902
- [37] Papayannopoulos V., Metzler K.D., Hakkim A., Zychlinsky A.: Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.*, 2010; 191: 677–691
- [38] Papayannopoulos V., Zychlinsky A.: NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.*, 2009; 30: 513–521
- [39] Parseghian M.H., Luhrs K.A.: Beyond the walls of the nucleus: the role of histones in cellular signaling and innate immunity. *Biochem. Cell Biol.*, 2006; 84: 589–604
- [40] Ramos-Kichik V., Mondragón-Flores R., Mondragón-Castelán M., Gonzales-Pozos S., Muniz-Hernandez S., Rojas-Espinosa O., Chacón-Salinas R., Estrada-Parra S., Estrada-García I.: Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 2009; 89: 29–37
- [41] Remijsen Q., Berghe T.W., Wirawan E., Asselbergh B., Parthoens E., de Rycke R., Noppen S., Delforge M., Willems J., Vandenabeele P.: Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Research*, 2011; 21: 290–304
- [42] Remijsen Q., Kuijpers T.W., Wirawan E., Lippens S., Vandenabeele P., Vanden Berghe T.: Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ.*, 2011; 18: 581–588
- [43] Remijsen Q., Vandenabeele P., Willems J., Kuijpers T.W.: Reconstitution of protection against *Aspergillus* infection in chronic granulomatous disease (CGD). *Blood*, 2009; 114: 3497
- [44] Saffarzadeh M., Juenemann C., Queisser M.A., Lochnit G., Barreto G., Galuska S.P., Lohmeyer J., Preissner K.T.: Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One*, 2012; 7: e32366
- [45] Simon D., Hoesli S., Roth N., Staedler S., Yousefi S., Simon H.U.: Eosinophil extracellular traps in skin diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2011; 127: 194–199
- [46] Steinberg B.E., Grinstein S.: Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci. STKE*, 2007; pe11
- [47] Urban C.F., Ermert D., Schmid M., Abu-Abed U., Goosmann C., Nacken W., Brinkmann V., Jungblut P.R., Zychlinsky A.: Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.*, 2009; 5: e1000639
- [48] Urban C.F., Reichard U., Brinkmann V., Zychlinsky A.: Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell. Microbiol.*, 2006; 8: 668–676
- [49] von Köckritz-Blickwede M., Goldmann O., Thulin P., Heinemann K., Norrby-Teglund A., Rohde M., Medina E.: Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood*, 2008; 111: 3070–3080
- [50] von Köckritz-Blickwede M., Nizet V.: Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. *J. Mol. Med.*, 2009; 87: 775–783
- [51] Wang Y., Li M., Stadler S., Corral S., Li P., Wang D., Hayama R., Leonelli L., Han H., Grigoryev S.A., Allis C.D., Coonrod S.A.: Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell Biol.*, 2009; 184: 205–213
- [52] Wartha F., Beiter K., Albigler B., Fernebro J., Zychlinsky A., Normark S., Henriques-Normark B.: Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell. Microbiol.*, 2007; 9: 1162–1171

- [53] Webster S.J., Daigneault M., Bewley M.A., Preston J.A., Marriott H.M., Walmsley S.R., Read R.C., Whyte M.K., Dockrell D.H.: Distinct cell death programs in monocytes regulate innate responses following challenge with common causes of invasive bacterial disease. *J. Immunol.*, 2010; 185: 2968–2979
- [54] Wilkie R.P., Vissers M.C., Draganow M., Hampton M.B.: A functional NADPH oxidase prevents caspase involvement in the clearance of phagocytic neutrophils. *Infect. Immun.*, 2007; 75: 3256–3263
- [55] Yost C.C., Cody M.J., Harris E.S., Thornton N.L., McInturff A.M., Martinez M.L., Chandler N.B., Rodesch C.K., Albertine K.H., Petti C.A., Weyrich A.S., Zimmerman G.A.: Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. *Blood*, 2009; 113: 6419–6427
- [56] Yousefi S., Gold J.A., Andina N., Lee J.J., Kelly A.M., Kozłowski E., Schmid I., Straumann A., Reichenbach J., Gleich G.J., Simon H.U.: Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat. Med.*, 2008; 14: 949–953
- [57] Yousefi S., Mihalache C., Kozłowski E., Schmid I., Simon H.U.: Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.*, 2009; 16: 1438–1444
- [58] Zhang H., Sun C., Glogauer M., Bokoch G.M.: Human neutrophils coordinate chemotaxis by differential activation of Rac1 and Rac2. *J. Immunol.*, 2009; 183: 2718–2728

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.