

Aktualne poglądy na znaczenie neutrofilów w reumatoidalnym zapaleniu stawów. Wciąż neutrofile czy może już mikrofagi?

Current view on the role of neutrophils in rheumatoid arthritis. Still neutrophiles or maybe already microphages?

Michał Gajewski¹, Przemysław Rzodkiewicz^{1,2}, Sławomir Maśliński^{1,2}

¹Zakład Biochemii Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie

²Katedra i Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Słowa kluczowe: neutrofile, reumatoidalne zapalenie stawów, makrofagi, mikrofagi, apoptoza.

Key words: neutrophils, rheumatoid arthritis, macrophages, microphages, apoptosis.

Streszczenie

Poglądy na rolę neutrofilów w procesie zapalnym na przestrzeni ostatnich lat uległy fundamentalnym zmianom. Neutrofile są krótko żyjącymi, finalnie zróżnicowanymi fagocytami. Ponieważ w wyniku kontaktu z patogenem ulegają szybkiej aktywacji, nazywane są często pierwszą linią obrony organizmu. Zaktywowane neutrofile żyją już bardzo krótko, ulegając apoptozie (*kamikaze cells*). W reumatoidalnym zapaleniu stawów neutrofile mogą być fagocytowane przez makrofagi, tworząc charakterystyczne komórki Reitera. Ostatnio wykazano, że migracja neutrofilów do tkanek hamuje proces apoptozy, a tym samym ich przedłużająca się aktywność może skutkować znacznym wydłużeniem czasu trwania procesu zapalnego. Ponadto wykazano, że neutrofile nie są komórkami jedynie biernie odpowiadającymi na zewnętrzne sygnały, ale odgrywają aktywną rolę w inicjacji i regulacji procesu zapalnego poprzez wydzielanie prozapalnych cytokin, ekspresję receptorów MHC klasy II, a tym samym biorą udział w aktywacji i kontroli aktywności limfocytów T. Wykazano istotne znaczenie neutrofilów w patogenezie takich chorób, jak przewlekła obturacyjna choroba płuc, choroba Behçeta czy zapalenia stawów. Komórki te, w kontekście najnowszej wiedzy o ich roli, powinny w przyszłości stać się ważnym celem nowych terapii reumatoidalnego zapalenia stawów.

Summary

Our understanding of the role of neutrophils in inflammation has changed fundamentally over recent years. Neutrophils are short-lived polymorphonuclear phagocytes. Since, as a result of contact with pathogens, they undergo rapid activation, they are often called the body's first line of defence. Activated neutrophils are short-lived and rapidly undergo apoptosis (*kamikaze cells*). In rheumatoid arthritis, neutrophils can be phagocytosed by macrophages, creating characteristic Reiter cells. Current findings show that migration of neutrophils from circulation to the tissues extend their life span by inhibition of apoptosis; this may prolong the inflammatory reaction. It is now accepted that neutrophils are not only cells passively responding to external signals, but they also play an active role in the initiation and regulation of the inflammatory process by secreting proinflammatory cytokines, expression of MHC class II receptor, thus they are involved in the activation and control of the T cell activity. The importance of neutrophils in the pathogenesis of diseases such as chronic obstructive pulmonary disease, Behçet's disease or arthritis has been demonstrated. These cells, in the context of this new knowledge, should become in the future an important target of the new treatment strategies in rheumatoid arthritis.

Dotychczasowe poglądy na rolę neutrofilów

Neutrofile to jedne z głównych elementów obrony organizmu przed patogenami [1]. Produkowane są w szpiku kost-

nym, którego 60% jest aktywne w procesie granulopoezy, a w ciągu dnia następuje 4-krotna wymiana całej puli neutrofilów we krwi [2]. We krwi zdrowych osób neutrofile sta-

Adres do korespondencji:

dr n. med. Michał Gajewski, Zakład Biochemii, Instytut Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher, ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa, tel. +48 22 646 39 96

Praca wpłynęła: 25.07.2011 r.

nowią ok. 40–60% wszystkich białych krwinek. Neutrofile jako pierwsze zjawiają się w miejscach objętych procesem zapalnym, dlatego często nazywane są pierwszą linią obrony. Na skutek kontaktu z czynnikami obcymi lub uszkodzonymi tkankami organizmu dochodzi do ich szybkiej aktywacji [2–5].

Mechanizm, za pomocą którego neutrofile spełniają swoje funkcje obronne, jest znany właściwie już od kilkadziesiąt lat [5]. Wykazano, że komórki fagocytykujące emitują światło (w zakresie fal podczerwonych), którego emisję skorelowano z bardzo znacznym poborem tlenu z otoczenia. Nazwano to wybuchem oddechowym (*respiratory burst*), sądzono bowiem, że fagocytykujące komórki wymagają dostarczenia im znacznych ilości tlenu do wyprodukowania energii niezbędnej do energochłonnego procesu fagocytozy [6, 7]. Okazało się jednak, że komórki fagocytykujące są w organizmie człowieka praktycznie jedyne komórki oddychające beztlenowo, ich metabolizm energetyczny ogranicza się do procesu beztlenowej glikolizy. Pobrane przez neutrofile tlen służy, poprzez układ NADPH oksydazy, do produkcji aktywnych metabolitów tlenowych (AMT). Są nimi: anion ponadtlenkowy (O_2^-), nadtlenek wodoru (H_2O_2) oraz rodnik hydroksylowy (OH^\cdot). Markerem ich powstawania jest właśnie emisja światła (chemiluminescencja), gdzie przejściu wzbudzonych AMT w stan podstawowy towarzyszy wytworzenie kwantu energii (światła). Uruchomienie systemu NADPH oksydazy prowadzi następnie do powstania czynników niezbędnych do dalszych przemian katalizowanych przez mieloperoksydazę (MPO). W obecności tego enzymu (stanowiącego do 5% wszystkich białek komórek neutrofilów) z jonów chloru oraz H_2O_2 powstają aktywne związki chloru, a finalnie cyjanowodor. Obecność tych substancji zapewnia niszczenie nawet opornych mikroorganizmów, a cały system jest nazywany tlenowo-zależnym „układem zabijania wewnątrzkomórkowego” [2, 7].

Nowe spojrzenie na rolę aktywnych metabolitów tlenowych

Wydzielane przez neutrofile AMT, wraz z enzymami proteolitycznymi, są przypuszczalnie najważniejszym czynnikiem toksycznym, jaki potrafią wyprodukować te komórki. Jednak produkowane wewnątrzkomórkowo mogą powodować zmiany potencjału redoks, znacząco modulując funkcje receptorów, aktywność enzymów, poziom i aktywność czynników transkrypcyjnych czy genów. Aktywne metabolity tlenowe mogą np. aktywować transkrypcyjny czynnik jądrowy (NF- κ B), odpowiedzialny za poziom produkcji chemokin czy cytokin w samych neutrofilach, znajdujących się w miejscach objętych procesem zapalnym. Neutrofile przylegające do komórek, takich jak makrofagi czy komórki endotelialne, mogą z kolei modulować poziom wewnątrz-

komórkowego przekazywania bodźców we wnętrzu tych ostatnich [6, 7].

W metabolizmie oksydacyjnym neutrofilów biorą udział również przeciwciała. Jak wykazano niedawno, działając jako katalizator, wykorzystują one AMT wytwarzane przez neutrofile (np. tzw. singlety tlenu) i przetwarzają je w trójatomową postać tlenu, czyli ozon. Ozon ma silne właściwości bakterioobójcze, a jego trwałość w roztworach wodnych wystarcza do skutecznego działania na dalsze odległości. Ta bardzo stara ewolucyjnie zdolność jest pozostałością z czasów, gdy immunoglobuliny nie były jeszcze odpowiedzialne za poszukiwanie czynników zakaźnych w organizmie, a jedynie za przekształcanie AMT w inne, mniej aktywne substancje, a dopiero potem wyspecjalizowały się one w wyszukiwaniu i niszczeniu obcych struktur (bakterii) [8].

Wykazano niedawno, iż neutrofile mogą formować zewnątrzkomórkowe struktury, zwane NETs (*neutrophil extracellular traps*), złożone z chromatyny DNA, histonów, białek pochodzących z ziarnistości neutrofilów czy enzymów proteolitycznych [9]. System ten jest zależny od aktywacji NADPH oksydazy i efektywny przy zwalczaniu bakterii lub grzybów. Jego uruchomieniu towarzyszy jednak śmierć komórki neutrofila, przy czym jest ona niepodobna ani do nekrozy, ani do apoptozy, została więc nazwana NETozą (*NETosis*). Oddziałuje on niejako na odległość od komórki neutrofila i, co ważniejsze, pozostaje aktywny nawet po śmierci komórki wydzielającej [10]. Sugeruje się nawet, iż kwasy nukleinowe, zawarte w tych zewnątrzkomórkowo wydzielanych strukturach, mogą być odpowiedzialne za rozwój pewnych chorób autoimmunologicznych, takich jak toczeń rumieniowaty układowy, który polega na nasilonej reakcji wobec własnego DNA [11]. To nowy, bardzo obiecujący kierunek badań.

Neutrofile w reumatoidalnym zapaleniu stawów

W większości dotychczasowych badań dotyczących patogenezы reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS) zwracano przede wszystkim uwagę na znaczenie limfocytów T w rozwoju tej choroby, mają one jednak tylko niewielkie możliwości bezpośredniego uszkodzenia tkanek. Komórkami odpowiadającymi za większość bezpośrednich uszkodzeń w jamie stawu są prawdopodobnie neutrofile, których liczba w płynie stawowym pacjentów z RZS może wynosić nawet do 5×10^9 [2, 3].

Zasadnicze znaczenie neutrofilów zarówno dla procesu inicjowania, jak i prolongacji zapalenia w przebiegu RZS wykazali Wipke i Allen [12]. W modelu mysiego RZS samo tylko przeniesienie osocza z neutrofilami od myszy chorej do zdrowej powodowało u zdrowej wystąpienie objawów charakterystycznych dla RZS. Co więcej, zaawansowanie

procesu zapalnego było skorelowane z liczbą przeniesionych neutrofilów. W przypadku nieobecności neutrofilów myszy były całkowicie odporne na przenoszone osocze myszy chorych. Pozbawienie zaś myszy neutrofilów, po 5 dniach trwania zainfekowanego RZS, powodowało całkowite zahamowanie procesu zapalnego [12]. Wydaje się, że zasadnicze znaczenie neutrofilów zarówno dla powstania, jak i utrzymywania się RZS zostało już dziś powszechnie zaakceptowane.

W przebiegu odpowiedzi zapalnej, oprócz AMT oraz mediatorów procesu zapalnego, neutrofile są ważnym źródłem enzymów proteolitycznych, które odgrywają istotną rolę w degradacji struktur stawowych. Obecny stan wiedzy na temat roli enzymów proteolitycznych w degradacji tkanki łącznej jest w dużym stopniu zasługą odkryć dokonanych w czasie badań realizowanych przez wiele lat w Zakładzie Biochemii Instytutu Reumatologii. Wojtecka-Łukasik pierwsza wyizolowała kolagenazę z granulocytów obojętnochłonnych krwi obwodowej w stopniu, który umożliwił określenie jej właściwości fizykochemicznych, biologicznych oraz wpływu na aktywność niektórych leków stosowanych w terapii chorób reumatycznych [13–17]. Istotne było również wskazanie w granulocytach obecności latentnej formy enzymu, oprócz jego aktywnej formy, oraz odkrycie jego aktywatora w reumatoidalnych płynach stawowych [18, 19].

Wykazano, że zawartość proenzymu kolagenazy w granulocytach jest znacznie większa niż aktywnego enzymu i stanowi potencjalne źródło aktywności kolagenolitycznej, które może być uruchamiane w procesach patologicznych przebiegających ze wzmożoną degradacją tkanki łącznej.

W całym królestwie zwierząt to właśnie neutrofile, szerzej – komórki fagocytujące odpowiedzialne za odporność nieswoistą, są pierwszą i najważniejszą linią obrony, zarówno w warunkach fizjologicznej normy, jak i w stanach patologicznych. Ich całkowita inaktywacja, analogiczna do inaktywacji odporności nabytej (AIDS), spowodowałaby śmierć człowieka na skutek nawracających, oportunistycznych zakażeń nie w ciągu kilku lat, lecz zaledwie kilku dni [2]. Nie kwestionuje się również faktu, iż to one są komórkami odpowiadającymi za większość uszkodzeń obserwowanych w RZS.

Badania nad metabolizmem neutrofilów *in vitro*, w warunkach maksymalnie zbliżonych do warunków *in vivo*

W eksperymentach przeprowadzonych w Instytucie Reumatologii wykazano, że badania nad metabolizmem neutrofilów powinny być prowadzone w warunkach maksymalnie odzwierciedlających warunki fizjologiczne [20, 21]. Jedynie fizjologiczne stężenia płynu stawowego (85%) powodowały znaczną zewnątrzkomórkową produkcję

AMT [21]. Doświadczenia innych ośrodków potwierdziły, iż płyn stawowy dopiero w stężeniach zbliżonych do fizjologicznych (50–75%) może z kolei w sposób istotny wpływać na proces apoptozy neutrofilów, czyli szybkość ich eliminacji z płynu stawowego [22]. Wykazano również, że to synergistyczne oddziaływanie ciśnienia i toksycznego wpływu neutrofilów decyduje o stopniu uszkodzenia tkanek. Ciśnienie wydaje się również czynnikiem znacząco modulującym oksydacyjny metabolizm neutrofilów. Zwiększone ciśnienie atmosferyczne, stymulując w neutrofilach MPO, czyli szlak zależny m.in. od nadtlenu wodoru, hamuje w nich równocześnie aktywność katalazy, enzymu inaktywującego nadtlenek wodoru [23].

Innym czynnikiem fizycznym, który powinien być brany pod uwagę, jest stężenie tlenu. Dotychczas badania nad metabolizmem neutrofilów prowadzono zazwyczaj w atmosferze zawierającej 21% O₂ (760 mm Hg) w 37°C. Tlen w takim stężeniu właściwie nie występuje w organizmie. Na powierzchni chrząstki stężenie tlenu wynosi np. 6–10%, w jej warstwie środkowej już tylko 1–3%, a w warstwach najgłębszych warunki są praktycznie beztlenowe. W płynie stawowym stężenie tlenu oceniane jest na 1–2%. Badania własne potwierdziły zasadność prowadzenia hodowli chondrocytów w warunkach fizjologicznych stężeń tlenu (2%), gdyż w rutynowo stosowanych warunkach doświadczalnych (21% O₂) hodowane komórki znajdowały się w warunkach hiperoksji, o czym świadczyło zwiększone stężenie markerów stresu oksydacyjnego [24]. W badaniach Cross [25] wykazano, iż to właśnie stężenie tlenu decyduje o czasie przeżycia neutrofilów w płynie stawowym pacjentów z RZS. Wykazano, że tylko w typowych warunkach doświadczalnych (ok. 21% tlenu) płyn stawowy wykazuje proapoptotyczne właściwości, natomiast w warunkach hipoksji (1% O₂), typowych przecież dla RZS, płyn stawowy wykazuje zdecydowanie antyapoptotyczne właściwości [25].

Doniesienia dotyczące wpływu płynu stawowego na proces apoptozy neutrofilów w RZS są sprzeczne. Hodowane neutrofile, izolowane od pacjentów z RZS, wykazywały z jednej strony przyspieszone tempo apoptozy, co świadczy o przewadze w płynie stawowym proapoptotycznych cytokin nad cytokinami antyapoptotycznymi [20], z drugiej jednak strony obserwowano antyapoptotyczny wpływ płynu stawowego pacjentów z RZS [26]. Wydaje się więc, iż w płynie stawowym relacje pomiędzy pro- i antyapoptotycznymi czynnikami decydują o przyszłym losie neutrofilów [25]. W badaniach nad interakcjami neutrofile–biurusztowania *in vitro* wykazano, iż śmierć neutrofilów nie ma charakteru ani typowej apoptozy, ani nekrozy i jest związana z nadmierną produkcją AMT [27]. Badania przeprowadzone w opracowanym w Instytucie Reumatologii modelu doświadczalnym (zmniejszenie stężenie tlenu, zmienne ciśnienie atmosferyczne) nie potwierdzają jednak istnienia opisywanej wcześniej nieznanej formy śmierci komórek przy-

legających do biorusztowań. W warunkach zbliżonych do panujących w jamie stawu pacjentów z RZS (85% płynu stawowego), komórki przylegające do biorusztowań podlegają typowej nekrozie [22]. Potwierdza to konieczność prowadzenia badań *in vitro* w warunkach możliwie maksymalnie zbliżonych do tych panujących *in vivo*.

W płynie stawowym w zbliżonych do fizjologicznych stężeniach (50%) neutrofile ulegają ponadto odróżnicowaniu w kierunku komórek dendrytycznych [28]. Wydaje się, iż w procesie tym odgrywają pewną rolę limfocyty T. Równocześnie neutrofile, stając się komórkami wykazującymi ekspresję antygenów MHC II klasy, same stają się aktywatorami limfocytów T. Sugeruje się, że to sprzężenie zwrotne odgrywa istotną rolę w indukowaniu przewlekłych zapaleń. Ponieważ neutrofile wykazujące ekspresję MHC klasy II aktywują zwrotnie komórki T (*crossstalk*), modulowanie relacji między komórkami biorącymi udział w zapaleniu wydaje się obiecującym kierunkiem w strategii leczenia RZS [1].

Zmiany podatności neutrofilów tkankowych na neurotransmitery. Neutrofile jako gruczoły dokrewne?

Układ nerwowy i immunologiczny są głównymi układami pozwalającymi zarówno na utrzymanie homeostazy, jak i adaptację organizmu do zmieniających się warunków. Ścisły związek, jaki je łączy, pozwala uznać układ odpornościowy za system, który – podobnie jak nerwowy – funkcjonuje na zasadzie organu zmysłowego (*sensory organ*) [29]. Jest „szóstym zmysłem” (*a sixth sense*), który rozszerza nasze zdolności rozpoznawania tego, co widzimy, słyszymy, dotykamy, również o zdolność rozpoznawania cząstek: bakterii, wirusów, komórek zdrowych czy nowotworowych [30]. Jednym z prawdziwie wielkich odkryć współczesnej biologii było odkrycie, iż te systemy wytworzyły jeden wspólny język, zarówno dla komunikacji wewnątrz danego systemu, jak i między nimi (*crossstalk*) [30].

Komórki immunologicznie czynne mają na swoich błonach receptory dla neurotransmiterów układu współczulnego i przywspółczulnego. Wykazano także, że mogą produkować, magazynować i wydzielać neurotransmitery układu adrenergicznego (*a new diffusely expressed adrenergic organ*) [31]. Aminy katecholowe uwalniane z neutrofilów lub makrofagów mogą regulować przebieg procesu zapalnego poprzez autokrynne bądź parakrynne oddziaływanie na komórki zapalne. Komórki te uwalniają do środowiska czynniki charakterystyczne dla komórek immunologicznie kompetentnych (m.in. cytokiny), oddziałujące poprzez modulację w komórkach stężeń cAMP lub cGMP, analogicznie do klasycznych hormonów. Mogą więc regulować „czysto” fizjologiczne procesy, podobnie jak hormony, np. interferon, analogicznie do antagonistów układu adre-

nergicznego, powoduje wzrost tempa bicia kardiomiocytów [30].

W badaniach własnych [32, 33] wykazano, że w przypadku neutrofilów izolowanych z tkanek chorobowo zmienionych (płyn stawowy pacjentów z RZS) stymulacja parasympatyczna wywiera ten sam skutek co sympatyczna – aktywność neutrofilów jest ograniczana. Wydaje się, że było to pierwsze doniesienie o jednoczesnym, hamującym procesie zapalnym, wpływie obu komponentów autonomicznego układu nerwowego: współczulnego i przywspółczulnego na neutrofile znajdujące się w ogniskach zapalnych [32]. Badania prowadzone nad podtypami receptorów układu przywspółczulnego, tj. muskarynowych cholinergicznymi (m1-m5), wykazały brak podtypu m2 na błonach zarówno neutrofilów izolowanych z krwi obwodowej zdrowych dawców, jak i neutrofilów z płynu stawowego, pobranych od pacjentów z RZS. Na błonach neutrofilów izolowanych z płynu stawowego pobranych od pacjentów z RZS, oprócz braku m2, zanotowano również brak podtypu m4, co powiązano z ich odmienną odpowiedzią na stymulację cholinergiczną (parasympatyczną) [33]. Potwierdziły to doniesienia Traceya [34], w których przedmiotem badań były nikotynowe, wrażliwe na α -bungarotoksynę, receptory cholinergiczne. Ekspozycja na stymulację cholinergiczną, nikotynę lub acetylocholinę (ACh) ludzkich makrofagów, powodowała zahamowanie wydzielania przez nie czynników prozapalnych, takich jak: czynnik martwicy nowotworów (*tumor necrosis factor* – TNF), interleukina 1 (IL-1) czy interleukina 8 (IL-8). Efektu tego nie wykazano na prekursorach makrofagów, jakimi są monocyty krążące we krwi. To makrofagi (znajdujące się w tkankach), a nie komórki monocytów (we krwi) produkują większość prozapalnych cytokin, takich jak TNF, IL-1 czy IL-8. Aktywacja ich receptorów cholinergicznymi powoduje zahamowanie syntezy i wydzielania cytokin prozapalnych, natomiast pozostaje bez wpływu na produkcję i wydzielanie cytokin przeciwzapalnych (takich jak IL-10) [34].

Badania Traceya [34] potwierdzają doniesienia autorów o analogicznym do współczulnego wpływie układu przywspółczulnego na aktywację neutrofilów izolowanych z płynu stawowego. Potrzebne są dalsze badania nad zjawiskiem „przeprogramowania się” neutrofilów krwi obwodowej (o zróżnicowanej reakcji na neurotransmitery układu adrenergicznego i cholinergicznego) w kierunku neutrofilów „tkankowych” (płyn stawowy jest tkanką), w których oba systemy ograniczają aktywność neutrofilów, a tym samym intensywność procesu zapalnego. Ten kierunek badań wydaje się niezwykle obiecujący w dalszym zrozumieniu roli neutrofilów w RZS.

Low density granulocytes

Do niedawna jeszcze uważano, że populacja neutrofilów jest jednorodna. Wykazano jednak istnienie subpo-

pulacji o wyraźnie zwiększonej ekspresji receptorów dla fMLP czy aktywności wobec *Staphylococcus aureus*. Jedynie 5–8% neutrofilów ma receptory umożliwiające rozpoznanie komórek T, a po ich ekspozycji na cytokiny, subpopulacja jedynie 8–17% neutrofilów wykazuje znacznie przedłużony (ponad 72 godziny) okres życia [4]. Badania nad monocytami pacjentów z toczniem rumieniowatym układowym (TRU) wykazały istnienie w obrębie ich frakcji charakterystycznej subpopulacji neutrofilów, nazwanych LDGs (*low density granulocytes*) [35]. Mają one, w porównaniu z neutrofilami kontrolnymi, izolowanymi od zdrowych dawców, obniżony poziom fagocytozy, ale podwyższony poziom wydzielanego IFN typu I. Jest on na tyle wysoki, że uniemożliwia przekształcenie się endotelialnych komórek progenitorowych (EPC) w dojrzałe komórki endotelium. Pozbawienie krwi obwodowej frakcji LDGs przywraca możliwość fizjologicznego tempa różnicowania się EPC w kierunku komórek endotelialnych. Sugeruje się, iż to właśnie może być przyczyną zaburzeń układu krążenia w przebiegu TRU: równoczesne uszkodzenie naczyń przez neutrofile w procesie zapalnym i hamowanie ich odtwarzania, poprzez obecność frakcji LDGs neutrofilów [35]. Dalsze badania tego podtypu neutrofilów może mieć fundamentalne znaczenie dla badań nad ograniczeniem rozwoju RZS, gdyż krążące we krwi EPC, osiadające w rozrastającej się tkance, zapewniają jej dalszy rozwój poprzez nasilenie procesu neowaskularyzacji [28].

Neowaskularyzacja jest charakterystycznym zjawiskiem dla RZS. Zmiany w mikrokrążeniu polegają zarówno na angiogenezie (prolifercja i rozgałęzienie istniejących mikronaczyń), jak i waskulogenezie (tworzenie nowych). Do niedawna uważano, że neowaskularyzacja w dojrzałych tkankach zachodzi głównie poprzez angiogenezę. Odkrycie EPC (1999 r.) pozwoliło na przededefiniowanie klasycznego paradygmatu dotyczącego rozwoju naczyń krwionośnych, a rolę EPC w neowaskularyzacji *synovium* uznano za krytyczną dla patogenezy RZS (*critical to RA pathogenesis*) [28, 36]. Ekspansję naczyń krwionośnych stwierdzano, zanim zauważalne stały się kliniczne objawy RZS. Nowe naczynia tworzą przejście dla wejścia do jamy stawu krążących leukocytów, które przyspieszają zapalenie oraz dostarczają składników odżywczych dla hiperproliferującego *synovium*. Wydaje się już pewne, iż we wszystkich modelach zapalenia (*inflammatory arthritis*) EPC infiltrują zmienione chorobowo *synovium* [28]. W przypadku RZS oczekiwanym efektem nowych terapii powinno być zahamowanie ich ekspansji do patologicznie zmienionej tkanki.

Neutrofile tkankowe

Neutrofile, które opuszczają krążenie i wkraczają w nowe środowisko, jakim jest tkanka, są eksponowane

na wiele czynników, takich jak cytokiny, czynniki wzrostu, produkty pochodzenia bakteryjnego oraz lokalne produkty tkankowe. Prowadzone w ostatnich latach badania nad neutrofilami wykazały, iż warunki panujące w ognisku zapalenia powodują zmianę wielu cech tych komórek. Specyficzne warunki zapalenia doprowadzają do zmiany fenotypu neutrofilów, wpływając zarówno na ich aktywność, jak również przeżycie, a zaktywowane neutrofile potrafią syntetyzować takie cytokiny, jak IL-8, IL-1, IL-1RA, IL-6, IL-12, transformujący czynnik wzrostu β (*transforming growth factor* β – TGF- β), TNF- α [6, 7].

Okres aktywnego oddziaływania neutrofilów w tkance z toczącym się procesem zapalnym może być znacząco wydłużony poprzez ograniczenie zjawiska apoptozy. W miejscu zapalenia wydzielanych jest wiele antyapoptotycznych mediatorów, co więcej, wydzielane przez same neutrofile takie czynniki, jak IL-1, IL-6 czy TNF, na zasadzie sprzężenia zwrotnego, mogą regulować proces apoptozy, ograniczając jego intensywność [7, 37]. W porównaniu z neutrofilami świeżo izolowanymi z krwi, neutrofile znajdujące się w tkankach są znacznie bardziej podatne na stymulację czynnikami wydzielanymi przez bakterie (fMLP), odpowiadając na nią blisko czterokrotnym zwiększeniem wytwarzania AMT [7]. Neutrofile krwi obwodowej, w przeciwieństwie do neutrofilów izolowanych z płynu stawowego chorych na RZS, nie wykazują ekspresji antygenów MHC klasy II. Wykazano jednocześnie ekspresję tych antygenów na powierzchni świeżo izolowanych neutrofilów, poddanych działaniu płynu stawowego [28, 38]. Neutrofile te prezentowały równocześnie fenotyp zbliżony do komórek dendrytycznych [38].

Oprócz antygenów MHC II na błonie komórkowej neutrofilów izolowanych od pacjentów z RZS zaobserwowano ekspresję innych białek, takich jak CD49, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, oraz zwiększoną ilość ICAM-1 [4, 38]. Wyniki te mogą sugerować, że w przypadku RZS u podłoża przedłużenia procesu zapalnego i zwiększenia uszkodzeń może leżeć wzajemna stymulacja między neutrofilami wykazującymi ekspresję MHC II oraz limfocytami T [1, 38].

Jak wykazał Araki [39], nieaktualny jest już pogląd, jakoby postmitotyczne neutrofile zachowywały się jedynie jak tzw. polimorfonuklearne komórki. Kiedy neutrofile hodowano w warunkach wzbogaconych czynnikami GM-CSF, TNF- α , IFN- γ i IL-4 czy czynnikiem stymulującym makrofagi (*macrophage colony-stimulating factor*), zaczynały one wykazywać zarówno morfologiczne, jak i cytochemiczne charakterystyki makrofagów, choć otwarte pozostało pytanie, czy mogły spełniać również i ich funkcje [39].

Równie nieaktualny okazał się pogląd, jakoby neutrofile ulegające apoptozie były eliminowane jedynie przez fagocytyczne je makrofagi (tworząc tzw. komórki Reitera). Zjawisko to zachodzi wprawdzie w jamie stawu, ale – jak zauważono – w płynie stawowym jest na ogół bardzo nie-

wiele makrofagów. Wykazano, iż neutrofile, oprócz patogenów czy części innych komórek, mogą fagocytować także inne, martwe neutrofile [40]. Zauważono to pierwotnie w miejscach intensywnych zapaleń i silnej infiltracji neutrofilów (tzw. *inflammatory loci-IF*). Aktywność makrofagów jest w takich miejscach dalece niewystarczająca, neutrofile przejmują ich funkcje, w ich fagosomach zauważyć można całe, apoptotyczne neutrofile. Przyjąć należy, iż neutrofile mogą naśladować (*mimic*) zachowanie makrofagów i jako profesjonalne „makrofagi” fagocytować inne neutrofile [40]. Zaklasyfikowanie neutrofilów jako komórek pełniących jedynie proste, toksyczne funkcje jest już nieaktualne.

Podsumowanie

Neutrofile, wytwarzając czynniki chemotaktyczne czy cytokiny, są czynnikiem sprawczym dla migracji, różnicowania się lub aktywacji limfocytów B i T oraz komórek prezentujących antygen, którymi zresztą same się stają. Tworzą niejako pomost pomiędzy nieswoistą a swoistą odpornością, co pozwala nam obecnie uważać ten system za jeden, wspólny.

Wydaje się, że już dzisiaj można przyjąć, iż warunki stanu zapalnego powodują tak duże zmiany (*switch*) fenotypu neutrofilów krążących w kierunku neutrofilów „tkankowych”, że można mówić o dwóch typach komórek, różniących się przede wszystkim długością życia oraz tym, iż w przypadku neutrofilów tkankowych zanotowano ich znaczące interakcje z komórkami układu odpornościowego, fibroblastami, komórkami endotelialnymi czy osteoblastami.

Jakie nowe funkcje można już dziś przypisać tym długo żyjącym neutrofilom tkankowym? O znaczącej roli neutrofilów, i wydzielanych przez nie cytokin, w procesach gojenia się świadczy fakt, iż u starych zwierząt, u których tempo fagocytozy jest znacznie mniejsze, mniejsze jest również tempo gojenia się [2]. Można by zasugerować, iż zwiększającej się roli koordynującej neutrofilów towarzyszy ich zmniejszająca się rola destrukcyjna.

Miecznikow, odkrywca fagocytozy, podzielił komórki fagocytyczne na makrofagi i mikrofagi, uważając, iż różnią się one jedynie rozmiarami, a nie funkcją. Przez długi czas, wbrew temu pogładowi, neutrofile uważano jedynie za komórki o niezwykle prostych funkcjach. Wydaje się, iż najlepszym potwierdzeniem założeń Miecznikowa będzie zdanie napisane prawie 100 lat później przez naukowców brytyjskich: [...] *that activated neutrophils can perform most (if not all) of the functions of macrophages* [7]. Neutrofile są już powszechnie uznane za ważne komórki decydujące (*decision-shapers*) o przebiegu zapalenia, co więcej, sugeruje się, iż lepsze poznanie specyficznej roli tych właśnie komórek może pomóc w odpowiedzi na jedno z najtrudniejszych pytań dotyczących procesów zapalnych czy zjawiska odporności: *what triggers an immune response?* [6].

Wydaje się również, iż to badania nad tym właśnie typem komórek mogą przynieść długo oczekiwaną przełom w terapii RZS.

Piśmiennictwo

1. Fillipin LI, Vercelino R, Marroni NP, et al. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2008; 152: 415-422.
2. Maśliński S, Gajewski M. Zapalenie. W: Patofizjologia. Maśliński S (red.). Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 2009.
3. Edwards SW, Hallett MB. Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Immunology Today* 1997; 18: 320-324.
4. Chakravarti A, Rusu D, Flamand N, et al. Reprogramming of a sub-population of human blood neutrophils by prolonged exposure to cytokines. *Lab Invest* 2009; 89: 1084-1099.
5. Allen RC. Halide dependence of the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system of the polymorphonuclear leukocyte in the phenomenon of electronic excitation. *Biochem Biophys Res Commun* 1972; 63: 675-682.
6. Cascao R, Rosario HS, Fonesca JE. Neutrophils: warriors and commander in immune mediated inflammatory diseases. *Acta Rheumatol Port* 2009; 34: 313-326.
7. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, et al. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology* 2010; 49: 1618-1631.
8. Wentworth P Jr, McDunn JE, Wentworth AD, et al. Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacteria killing and inflammation. *Science* 2002; 298: 2195-2199.
9. Brinkmann V, Reichard U, Goosman C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303: 1532-1535.
10. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophils extracellular traps. *J Cell Biol* 2007; 176: 231-241.
11. Wartha F, Beiter K, Normark S, et al. Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 2007; 10: 52-56.
12. Wipke BT, Allen PM. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2001; 167: 1601-1608.
13. Wojtecka-Łukasik E, Dancewicz AM. Inhibition of human leukocyte collagenase by some drugs used for therapy of rheumatic diseases. *Biochem Pharmacol* 1974; 23: 2077-2081.
14. Wojtecka-Łukasik E, Dancewicz AM. Kolagenaza leukocytów ludzkich. Izolacja, oczyszczanie i właściwości. *Przegl Lek* 1974; 21: 431-442.
15. Wojtecka-Łukasik E. Kolagenaza leukocytów ludzkich. *Reumatologia* 1978; 16: 99.
16. Wojtecka-Łukasik E. Zymogen kolagenazy leukocytów ludzkich i jego aktywacja. X Zjazd P.T. Biochemicznego, Poznań 1972, A-19.
17. Dancewicz AM, Wojtecka-Łukasik E. Purification and properties of collagenase from human leukocytes. *Gordon Conference on New Trends in Collagen Research. Monachium, RFN* 1973; 61.
18. Krauze D, Wojtecka E. Activation of leukocyte collagenase proenzyme by rheumatoid synovial fluid. *Biochim Biophys Acta* 1972; 285: 436-446

19. Sopata I, Wojtecka-Łukasik E, Dancewicz AM. Solubilization of collagen fibrils by leukocyte collagenase activated by rheumatoid synovial fluid. *Acta Bioch Pol* 1974; 21: 283-289.
20. Gajewski M, Szczepanik S, Wysocki Ł i wsp. The effect of increasing amounts of synovial fluid isolated from patients with rheumatoid arthritis on the respiratory burst of human neutrophils. *Reumatologia* 2009; 47: 273-281.
21. Gajewski M, Rzdokiewicz P, Szczepanik S i wsp. Interakcje neutrofilów i chondrocytów hodowanych na biorusztowaniach zawieszonych w płynie stawowym i poddanych działaniu zmieniających ciśnienia. *Reumatologia* 2010; 48: 307-316.
22. Bell AL, Magill MK, Irvine AE. Human blood and synovial fluid neutrophils cultured in vitro undergo programmed cell death which is promoted by the addition of synovial fluid. *Ann Rheum Dis* 1995; 54: 910-915.
23. Nguyen HX, Lulis AJ, Tidball JG. Null activation of myeloperoxidase in mice prevents mechanical activation of neutrophil lysis of muscle cell membranes in vitro and in vivo. *J Physiol* 2005; 565: 403-413.
24. Gajewski M, Warnawin E, Gajewska J i wsp. Badania nad mechanizmem toksycznego oddziaływania neutrofilów na chondrocyty hodowane w różnych stężeniach tlenu. *Reumatologia* 2006; 44: 76-86.
25. Cross A, Barnes T, Bucknall RC, et al. Neutrophil apoptosis in rheumatoid arthritis is regulated by local oxygen tension within joints. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 521-528.
26. Ottonello L, Cutolo M, Frumento G, et al. Synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis inhibits neutrophil apoptosis: role of adenosine and proinflammatory cytokines. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41: 1249-1260.
27. Takei H, Araki A, Watanabe H, et al. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis and necrosis. *J Leukocyte Biol* 1996; 59: 229-240.
28. Silverman MD, Haas CS, Rad AM, et al. The role of vascular cell adhesion molecule 1/very late activation antigen 4 in endothelial progenitor cell recruitment to rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 1817-1826.
29. Blalock JE. The immune system as a sensory organ. *J Immunol* 1984; 132: 1067-1070.
30. Blalock JE. The immune system as the sixth sense. *J Intern Med* 2005; 257: 126-138.
31. Fierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang M, et al. Catecholamines-crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening Pandora's box. *Mol Med* 2008; 14: 195-204.
32. Gajewski M, Gujski M, Książopolska-Pietrzak K, et al. The influence of adrenergic and cholinergic agents on respiratory burst of human neutrophils from peripheral blood and synovial fluid. *J Physiol Pharmacol* 1997; 48 (Supl 2): 72-79.
33. Bany U, Gajewski M, Książopolska-Pietrzak K, et al. Expression of mRNA encoding muscarinic receptor subtypes in neutrophils of patients with rheumatoid arthritis. *Ann NY Acad Sci* 1999; 876: 301-304.
34. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002; 420: 853-859.
35. Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, et al. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I interferons. *J Immunol* 2010; 184: 3284-3297.
36. Haneline LS. Redox regulation of stem and progenitor cells. *Antioxidants Redox Signaling* 2008; 10: 1849-1852.
37. Cross A, Bucknall RC, Cassatella MA, et al. Synovial fluid neutrophils transcribe and express class II major histocompatibility complex molecules in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2796-2806.
38. Iking-Konert C, Ostendorf B, Sander O, et al. Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils to dendritic-like cells at the site of inflammation in rheumatoid arthritis: evidence for activation by the T cells. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1436-1442.
39. Araki H, Katayama N, Yamashita Y, et al. Reprogramming of human postmitotic neutrophils into macrophages by growth factors. *Blood* 2004; 103: 2973-2980.
40. Rydell-Tormanen K, Uller L, Erjefalt JS. Neutrophil cannibalism – a back up when the macrophage clearance system is insufficient. *Respiratory Res* 2006; 7: 143.